

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERinarie

INDIRIZZO DI SANITÀ PUBBLICA E PATOLOGIA COMPARATA

CICLO XXV

**L'ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN CEPPI DI *E. COLI*
ISOLATI DA SPECIE AVIARI E CUNICOLE
COMMERCIALI E SELVATICHE**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gianfranco Gabai

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Mauro Dacasto

Supervisore: Dott.ssa Alessandra Piccirillo

Dottoranda: Dr.ssa Giorgia Dotto

Indice

	Pagina
RIASSUNTO	1
ABSTRACT	2
INTRODUZIONE	
1. La minaccia della resistenza batterica agli antimicrobici	4
2. La sorveglianza dell'antibiotico-resistenza in Europa	7
2.1 Sorveglianza dell'antibiotico-resistenza in batteri di origine umana	7
2.2 Sorveglianza dell'antibiotico-resistenza in batteri di origine animale	9
3. Diffusione dell'antibiotico-resistenza	12
3.1 nell'uomo	12
3.2 negli animali e nelle derrate di origine animale	14
4. L'importanza del monitoraggio dell'antibiotico-resistenza nei batteri patogeni e commensali	17
4.1 <i>Escherichia coli</i>	18
4.1.1 <i>E. coli</i> patogeno nell'uomo	19
4.1.2 <i>E. coli</i> patogeno nell'allevamento avicolo	21
4.1.3 <i>E. coli</i> patogeno nell'allevamento cunicolo	22
5. Meccanismi naturali e acquisiti di antibiotico-resistenza	24
5.1 Strutture genetiche coinvolte nel trasferimento orizzontale dell'antibiotico-resistenza	28
5.1.1 Gli integroni	28
5.1.2 I trasposoni	32
5.1.3 I plasmidi	33
5.1.4 Classificazione dei plasmidi	35
6. I chinoloni e i fluorochinoloni	37
6.1 Modalità d'azione e meccanismi di resistenza	39
 STUDIO A: Profili fenotipici di antibiotico-resistenza e ricerca di integroni e geni PMQR in ceppi di <i>E. coli</i> isolati da lagomorfi commerciali e selvatici	
1A. Introduzione e scopo dello studio	45

2A. Materiali e metodi	47
2A.1 Campioni oggetto d'indagine	47
2A.2 Determinazione dei profili fenotipici di antibiotico-resistenza	49
2A.2.1 Valutazione della sensibilità agli antimicrobici	49
2A.3 Ricerca e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e di classe 2	50
2A.3.1 Estrazione del DNA batterico	50
2A.3.2 Ricerca di integroni di classe 1 e classe 2 mediante <i>real-time</i> PCR	51
2A.3.3 Amplificazione della regione variabile degli integroni	53
2A.3.4 Sequenziamento nucleotidico delle regioni variabili	54
2A.3.5 Analisi delle sequenze	55
2A.4 Tipizzazione batterica mediante <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	55
2A.4.1 Amplificazione e sequenziamento dei 7 <i>loci</i> genici	55
2A.4.2 Analisi dei dati	57
2A.5 Ricerca dei geni <i>Plasmid Mediated Quinolone Resistance</i> (PMQR)	58
2A.5.1 Ricerca dei geni PMQR mediante PCR <i>end-point</i>	58
2A.6 Tipizzazione plasmidica mediante <i>PCR Based Replicon Typing</i> (PBRT)	60
2A.6.1 Amplificazione e sequenziamento dei repliconi	60
2A.7 Verifica della localizzazione degli integroni a livello plasmidico	64
2A.7.1 Estrazione del DNA plasmidico	64
2A.7.2 Trasformazione di cellule batteriche competenti	64
2A.7.3 Ricerca degli integroni nelle cellule batteriche trasformanti e tipizzazione del contenuto plasmidico	64
3A. Risultati	65
3A.1 Valutazione della sensibilità alle molecole antimicrobiche	65
3A.1.1 Profili di antibiotico-resistenza	65
3A.1.2 Profili di multifarmaco-resistenza	68
3A.2 Presenza e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e di classe 2	70
3A.2.1 <i>E. coli</i> isolati da conigli commerciali	70
3A.2.2 <i>E. coli</i> isolati da conigli selvatici	71
3A.2.3 <i>E. coli</i> isolati da lepri	72
3A.3 <i>Plasmid Mediated Quinolone Resistance</i> (PMQR)	74
3A.3.1 Presenza dei geni <i>qnr</i> , <i>qepA</i> e <i>oqxAB</i>	74

3A.4 Tipizzazione molecolare dei ceppi	76
3A.4.1 <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	76
3A.4.2 Analisi filogenetica	81
3A.5 Tipizzazione plasmidica	84
3A.6 Trasformazione batterica	86
4A. Discussione	87
4A.1 Profili fenotipici di antibiotico-resistenza	87
4A.2 Profili genotipici di anribiotico-resistenza	90
 STUDIO B: Profili fenotipici di antibiotico-resistenza e ricerca di integroni in ceppi di E. coli isolati da volatili commerciali e selvatici	
1B. Introduzione e scopo dello studio	102
2B. Materiali e metodi	104
2B.1 Campioni oggetto d'indagine	104
2B.2 Determinazione dei profili fenotipici di antibiotico-resistenza	106
2B.2.1 Valutazione della sensibilità agli antimicrobici	106
2B.3 Ricerca e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e di classe 2	107
3B. Risultati	108
3B.1 Valutazione della sensibilità alle molecole antimicrobiche	108
3B.1.1 Profili di antibiotico-resistenza	108
3B.1.2 Profili di multifarmaco-resistenza	113
3B.2 Presenza e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e di classe 2	115
3B.2.1 <i>E. coli</i> isolati da volatili domestici	115
3B.2.1.1 <i>E. coli</i> AFEC e APEC isolati da tacchini	115
3B.2.1.2 <i>E. coli</i> APEC isolati da broiler	122
3B.2.2 <i>E. coli</i> AFEC e APEC isolati da volatili selvatici	125
4B. Discussione	127
4B.1 Profili fenotipici e genotipici di antibiotico-resistenza	127
 CONCLUSIONI	140
 BIBLIOGRAFIA	143

Riassunto

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza rappresenta un grave problema per la sanità pubblica e la sua diffusione è attribuita principalmente alla capacità dei batteri di scambiarsi orizzontalmente materiale genetico attraverso plasmidi, spesso associati agli integroni (Sunde and Norstrom, 2006). Questo studio nasce con l'obiettivo di definire i profili fenotipici e genotipici di antibiotico-resistenza, in particolare la presenza e la caratterizzazione degli integroni di classe 1 e 2 in *E. coli* isolati sia da volatili che da lagomorfi domestici e selvatici campionati in Italia tra il 2006 e il 2012. I ceppi isolati da quest'ultima categoria di animali sono stati sottoposti anche a tipizzazione molecolare mediante *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e del contenuto plasmidico. Mediante *PCR-Based Replicon Typing* (PBRT). Inoltre sono stati ricercati i geni *Plasmid Mediated Quinolone Resistance* (PMQR) responsabili di una ridotta sensibilità ai chinoloni e fluorochinoloni. La presenza degli integroni di classe 1 è stata riscontrata in ceppi con profili di multifarmaco-resistenza isolati sia da volatili che da lagomorfi domestici e selvatici. Gli integroni di classe 2 sono stati invece rilevati soltanto negli *E. coli* di origine aviaria. Le cassette geniche riscontrate di frequente sono state varie combinazioni dei geni *aadA*, *sat* e *dfrA*, responsabili della resistenza agli aminoglicosidi e al trimethoprim. Il 12,2% degli isolati da lagomorfi domestici e selvatici è risultato positivo ai geni *oqxAB* e, ad eccezione di 3, isolati da conigli di allevamento. La maggior parte dei ceppi *oqxAB*-positivi apparteneva al CC17 e presentava nel proprio corredo da 1 a 7 classi di plasmidi diversi, quali IncF, IncHI1, IncI1, IncR, IncN, IncP, IncX1, IncY, e ColE. Questo studio fornisce un importante contributo sulla diffusione degli integroni e dei geni PMQR in ceppi isolati da animali sia domestici che selvatici e indica l'importante ruolo giocato da queste specie come *reservoir* di determinanti genetici di antibiotico-resistenza e quali possibili fonti di batteri antibiotico-resistenti per l'uomo.

Abstract

Antimicrobial-resistance is a public health problem world-wide and it is largely attributed to horizontal exchange of transferable genetic elements such as plasmids carrying integrons (Sunde and Norstrom, 2006). The aim of this study was to define the antimicrobial-resistance phenotypes and to characterize class 1 and class 2 integrons in *E. coli* isolated both from commercial and wild birds and lagomorphs between 2006 and 2012 in Italy. The strains isolated from lagomorphs were also genotyped and screened for Plasmid-Mediated Quinolones Resistance (PMQR) genes and plasmids. Strains were examined for antimicrobial susceptibility by agar disk diffusion method. Class 1 and class 2 integrons were detected by real-time PCR and gene cassettes content identified by DNA sequencing. PMQR genes were screened by PCR and DNA sequencing. Clonal relatedness of the isolates from lagomorphs was assessed by Multilocus Sequence Typing (MLST). Plasmids were characterized by PCR-Based Replicon Typing (PBRT). Class 1 integrons were detected in multi-drug resistant *E. coli* both from commercial and wild birds and lagomorphs while class 2 integrons were found only in domestic avian species. Different gene cassettes were identified but the most common were combinations of *aadA*, *sat* and *dfrA*, codifying for aminoglycosides and trimethoprim resistance. Of the 172 *E. coli* isolates from lagomorphs, 12.2% (21/172) carried *oqxAB*, none other PMQR determinants. All but 3 *oqxAB* positive *E. coli* strains were recovered from farm rabbits and most of them were associated with the predominant CC17 and carried from 1 to 7 different plasmid types, such as IncF, IncHI1, IncI1, IncR, IncN, IncP, IncX1, IncY, and ColE. This study provides new insights on the prevalence and dissemination of integrons and *oqxAB* in *E. coli* from farm and wild animals, suggesting that these species may be reservoir of these genetic determinants in Italy and thus a potential source of multi-drug resistant *E. coli* for humans.

Introduzione

1. La minaccia della resistenza batterica agli antimicrobici

La scoperta degli antimicrobici rappresenta indubbiamente una delle conquiste più importanti del XX secolo in campo medico, in quanto ha fornito una valida soluzione per la prevenzione e il trattamento di malattie infettive ritenute un tempo incurabili (EFSA, 2010b).

Il primo antibiotico, la penicillina, fu scoperto da Alexander Fleming nel 1928, per poi essere sviluppato come farmaco ed introdotto nella pratica clinica da Ernst Chain e Howard Florey negli anni '40. Questa scoperta valse loro il Premio Nobel per la Medicina nel 1945 (consultabile nel sito <http://www.nobelprize.org>).

Nonostante l'indiscutibile contributo svolto da queste molecole nel progresso della medicina, legato soprattutto ad una drastica riduzione della morbilità e mortalità associate a patologie di origine batterica, negli ultimi decenni l'efficacia degli antimicrobici è stata in parte offuscata dalla capacità dei batteri di sviluppare meccanismi di resistenza nei confronti della maggior parte delle molecole disponibili (Harbottle *et al.*, 2006; Van Hoek *et al.*, 2011).

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza consiste essenzialmente in un adattamento evolutivo che i batteri sono in grado di sviluppare come conseguenza della loro esposizione agli antimicrobici e può essere definito come la capacità dei microrganismi di sopravvivere e crescere in condizioni normalmente letali (Guardabassi and Kruse, 2008).

In un mondo dove si fa largo uso di queste molecole in diversi campi della medicina sia umana che animale e nella pratica zootecnica, negli ultimi anni si è assistito ad una rapida comparsa, selezione e diffusione di popolazioni batteriche antibiotico-resistenti negli animali, nell'ambiente e nell'uomo (EFSA and ECDC, 2012). Infatti, quando una molecola antimicrobica viene introdotta in un ecosistema, indipendentemente dal serbatoio animale in cui viene utilizzata, essa agisce come

forza selettiva nei confronti delle popolazioni batteriche, favorendo la progressiva crescita e diffusione di ceppi in grado di sopravvivere alla sua azione a scapito della popolazione invece sensibile. Tale fenomeno comporta una progressiva perdita di efficacia delle molecole antimicrobiche di uso comune e quindi la necessità di sviluppare sempre nuovi farmaci. Tuttavia, la comparsa di resistenze è certamente più rapida rispetto alla possibilità di sviluppo di nuove molecole (Van den Bogaard *et al.*, 2000; Guardabassi and Kruse, 2008; WHO, 2011; EFSA and ECDC, 2011; EFSA and ECDC, 2012).

Oggi questo fenomeno rappresenta una vera emergenza per la sanità pubblica sia nei Paesi sviluppati che in via di sviluppo con importanti ripercussioni economiche sulla società. Il trattamento di patologie, molte delle quali di origine alimentare, sostenute da batteri con profili di multifarmaco-resistenza (MDR), rappresenta infatti un costo particolarmente gravoso a causa dell'aumento delle complicazioni, della morbidità e della mortalità conseguenti. Si stima che in Europa i decessi riconducibili all'inefficacia dei trattamenti farmacologici delle infezioni sistemiche da batteri MDR (in particolare *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*) siano 25.000/anno (5,1 ogni 100.000 abitanti) ed un costo annuo per la collettività, legato alla spesa sanitaria e alle perdite produttive, di almeno 1,5 miliardi di euro (ECDC and EMEA, 2009).

L'attuale dimensione del problema ha raggiunto proporzioni tali da indurre Organi internazionali quali l'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization*, WHO), il Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) e l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food and Safety Authority*, EFSA) ad adottare strategie comuni a livello comunitario ed internazionale, volte a contenere il diffondersi della resistenza agli antimicrobici e a preservare il più possibile l'efficacia delle molecole esistenti. I provvedimenti adottati riguardano soprattutto

il rafforzamento dei sistemi di sorveglianza, la prevenzione delle infezioni batteriche, anche di origine alimentare, per ridurre la necessità di ricorrere agli antimicrobici e favorire la formazione e l'informazione su un uso prudente di queste molecole sia in medicina umana che nella pratica zootecnica (Rapporto ISTISAN 10/37, 2010; WHO, 2011).

2. La sorveglianza dell'antibiotico-resistenza in Europa

E' noto che l'uomo, gli animali e le derrate alimentari di origine animale possono fungere da *reservoir* di batteri antibiotico-resistenti. Per questo motivo, per poter monitorare il fenomeno dell'antibiotico-resistenza e comprendere le principali vie di diffusione e trasmissione, è fondamentale istituire un sistema di sorveglianza integrato che comprenda tutte le possibili fonti. Il monitoraggio è utile non soltanto per poter chiarire l'entità del problema, ma soprattutto affinché vengano garantiti, nella catena alimentare, interventi efficaci e mirati volti al contenimento della diffusione del fenomeno.

2.1 Sorveglianza dell'antibiotico-resistenza in batteri di origine umana

Nel 1998 l'Unione Europea ha deciso di istituire una rete di sorveglianza europea, l'*European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS), dove raccogliere i dati sulla prevalenza e diffusione dell'antibiotico-resistenza di ciascun Paese facente parte. A partire da gennaio 2010, questa rete ha assunto carattere istituzionale, *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net), è finanziata e coordinata dall'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) e funge da punto di raccolta e di controllo dei dati ottenuti dai sistemi di sorveglianza nazionali (EFSA and ECDC, 2012).

In particolare, l'EARS-Net, attraverso un *database* europeo denominato *The European Surveillance System* (TESSy), raccoglie i dati riguardanti la resistenza alle più importanti molecole antimicrobiche di sette patogeni di rilievo per la salute pubblica, in quanto responsabili di batteriemie e meningiti nell'uomo: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis/faecium*, *Klebsiella pneumoniae/oxytoca*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. La sorveglianza si basa es-

senzialmente sulle reti nazionali che sistematicamente raccolgono i dati provenienti dai laboratori di riferimento e li riportano nel *database* TESSy dell'ECDC (<http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/TESSy/Pages/TESSy.aspx>).

Per quanto riguarda il nostro Paese, già a partire dal 1999 con un progetto di sorveglianza pilota, evolutosi poi nel 2001 in un vero e proprio sistema di sorveglianza (AR-ISS), l'Istituto Superiore di Sanità raccoglie i dati provenienti da 48 laboratori presenti sul territorio nazionale relativi all'antibiotico-resistenza dei patogeni la cui sorveglianza è prevista dall'ECDC. I dati vengono quindi raccolti nella rete di sorveglianza nazionale ed inseriti nel *database* europeo (www.Epicentro.iss.it/focus/resistenza_antibiotici/resistenza.asp).

Oltre all'EARS-Net, l'ECDC coordina e finanzia anche un'altra rete di sorveglianza, l'*European Food and Waterborne Diseases and Zoonoses Network* (FWD-Net) avente come obiettivo la sorveglianza dei principali agenti zoonotici e patogeni di origine alimentare, in particolare *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *E. coli* produttore di verocitotossina (VTEC) (EFSA and ECDC, 2012 food).

Per quanto riguarda l'Italia, è stato istituito un sistema di sorveglianza denominato ENTER-NET Italia, sempre coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità, volto al monitoraggio delle infezioni sostenute da *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli* produttore di verocitotossina (VTEC), *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp. e *Yersinia* spp. e l'attuazione di un sistema di sorveglianza integrato uomo-animali-alimenti-ambiente grazie alla collaborazione con i laboratori veterinari di riferimento. Anche in questo caso, i dati raccolti attraverso questa rete vengono regolarmente inviati all'ECDC attraverso il sistema di sorveglianza TESSy (<http://www.iss.it/ente/>).

2.2 Sorveglianza dell'antibiotico-resistenza in batteri di origine animale

Per poter stimare la diffusione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza nella sua globalità ed avere indicazioni sulle possibili vie di trasmissione e diffusione nell'ambiente, è importante che la sorveglianza sia rivolta anche a batteri di origine animale isolati dalle principali categorie allevate nell'Unione Europea e dalle loro carni destinate al consumo umano. Infatti, in accordo con la normativa europea (Direttiva 2003/99/EC art. 7) sul monitoraggio delle zoonosi e degli agenti zoonosici, ogni Stato Membro è tenuto ad attuare sistemi di sorveglianza finalizzati ad ottenere dati comparabili relativi alla diffusione dell'antibiotico-resistenza nei batteri zoonotici che permettano di identificare tempestivamente situazioni particolarmente problematiche e di mettere in atto efficaci strategie d'intervento. In particolare, la Comunità Europea promuove la sorveglianza di *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. negli allevamenti intensivi di broiler, suini e bovini e, dal 1 gennaio 2010 anche di tacchini per quanto riguarda *Salmonella* spp. Il monitoraggio del fenomeno dell'antibiotico-resistenza in microorganismi commensali, quali *E. coli* ed enterococchi (*E. faecium* e *E. faecalis*), è invece consigliata ma non obbligatoria (Dir. 2003/99/EC e D.L. 2006/191; EFSA and ECDC, 2012).

I provvedimenti adottati dalla Comunità Europea al riguardo nascono principalmente dalla considerazione secondo cui la drammatica diffusione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza verificatasi negli ultimi anni è legata all'uso, talvolta massivo o improprio, di antimicrobici sia in medicina umana che veterinaria. Molto spesso infatti le molecole antimicrobiche utilizzate negli animali da reddito e da compagnia appartengono alle stesse classi di farmaci utilizzate per la terapia delle infezioni in medicina umana. E' quindi probabile che la rapida selezione e diffusione di cloni batterici antibiotico-resistenti patogeni, commensali e

talvolta ambientali sia riconducibile all'utilizzo di questi farmaci sia nell'uomo che negli animali (WHO; 2011).

La resistenza batterica che si sviluppa nelle produzioni zootecniche può essere trasmessa all'uomo mediante il consumo di alimenti contaminati oppure, a seguito della diffusione di popolazioni batteriche antibiotico-resistenti nell'ambiente, attraverso l'assunzione di acqua contaminata o tramite contatto diretto con gli animali. E' noto infatti che la maggior parte dei casi di infezioni nell'uomo sostenute da *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e da alcuni ceppi di *E. coli* patogeni sono da imputare al consumo di alimenti contaminati. Inoltre, se tali infezioni sono sostenute da batteri antibiotico-resistenti, il loro trattamento può risultare difficile a causa della mancanza di molecole antimicrobiche efficaci (EFSA, 2008a).

Non di minor rilievo, è la diffusione di batteri commensali con fenotipi di antibiotico-resistenza: questi batteri, infatti, pur non essendo responsabili di patologia, possono fungere da veri e propri *reservoir* di geni di resistenza facilmente trasmissibili orizzontalmente anche a batteri potenzialmente patogeni per l'uomo e/o per gli animali (EFSA, 2008b).

Per tutte queste ragioni e alla luce dell'importanza che il fenomeno dell'antibiotico-resistenza rappresenta per la salute pubblica, la Comunità Europea ha adottato una serie di provvedimenti volti a contenere il diffondere del fenomeno: rafforzare la sorveglianza dell'antibiotico-resistenza e del consumo di antimicrobici sia nell'uomo che negli animali, migliorare la prevenzione delle malattie infettive per ridurre la necessità di ricorrere ai trattamenti farmacologici, favorire la formazione, l'informazione e la ricerca in materia di antibiotico-resistenza (WHO, 2011).

In questo senso l'EFSA, organismo indipendente istituito dall'Unione Europea nel 2002 con l'obiettivo di garantire la sicurezza del consumatore in tema di alimenti, promuove il monitoraggio dell'antibiotico-resistenza sia nei batteri potenzialmente zoonosici circolanti negli allevamenti avicoli, di bovini e suini (*Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp.)

sia nei batteri commensali, definiti *indicatori*, albergati nell'intestino degli animali (EFSA and ECDC, 2012, Dir. 2003/99/EC).

Per quanto riguarda l'Italia, la sorveglianza dell'antibiotico-resistenza negli animali, in particolare lungo la filiera produttiva, è affidata agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) presenti nel territorio. Dal 2002 è stato istituito, quale Centro di riferimento nazionale per l'antibiotico-resistenza (CRAB), l'Istituto Zooprofilattico del Lazio e della Toscana (D.M. 8-5-2002 dalla Gazz. Uff. 22 maggio 2002, n. 118).

3. Diffusione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza

3.1 Nell'uomo

Sulla base di quanto riportato dall'ECDC nella relazione sulla sorveglianza della resistenza antimicrobica, tra il 2008 e il 2011 in Europa si è assistito ad un aumento dell'antibiotico-resistenza soprattutto nei patogeni gram-negativi posti sotto sorveglianza (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Il dato più allarmante riguarda l'aumento di patogeni multifarmaco-resistenti in più di un terzo dei 29 Paesi dichiaranti UE/SEE. A destare particolare preoccupazione è soprattutto la resistenza combinata a più classi di antimicrobici, quali cefalosporine di terza generazione, aminoglicosidi e fluorochinoloni, in *E. coli* e *K. pneumoniae* e l'aumento della resistenza nei confronti di farmaci "salva-vita", quali i carbapenemi (ECDC, 2012).

Inoltre, dai dati riportati nell'ultima relazione congiunta sulla resistenza agli antimicrobici stilata dall'EFSA e dall'ECDC, emerge un aumento dei casi umani di salmonellosi e campilobatteriosi sostenuti da batteri antibiotico-resistenti. In particolare, sono state riscontrate resistenze elevate nei confronti delle tetracicline, dell'ampicillina e dei sulfamidici nei ceppi di *Salmonella* spp., mentre in *Campylobacter* spp. soprattutto nei confronti dell'ampicillina e di chinoloni e fluorochinoloni quali l'acido nalidixico e la ciprofloxacina (EFSA and ECDC, 2012).

Dati più confortanti invece riguardano la frequenza dell'antibiotico-resistenza nei gram-positivi (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ed *Enterococcus faecium/faecalis*) in quanto il trend sembra stabilizzarsi e, in alcuni Paesi, persino diminuire (ECDC, 2012).

Per quanto riguarda l'Italia, dal rapporto sull'attività di sorveglianza nel triennio 2006-2008 a cura dell'Istituto Superiore di Sanità e dal rapporto annuale dell'EARS-Net del 2010, i dati più preoccupanti riguardano un aumento della diffusione dell'antibiotico-resistenza in particolare nei

batteri gram-negativi quali *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Per quanto riguarda *E. coli*, di rilievo è una resistenza elevata nei confronti delle aminopenicilline e fluorochinoloni, con un *trend* in progressivo aumento nel periodo compreso tra il 2003 e il 2010. Percentuali elevate di ceppi di *K. pneumoniae/oxytoca* resistenti sono state riscontrate nei confronti delle aminopenicilline (a cui sono intrinsecamente resistenti) e alle cefalosporine di terza generazione. Allarmante è soprattutto la presenza di percentuali elevate di *P. aeruginosa* resistenti alle aminopenicilline, alle cefalosporine di terza generazione e ai carbapenemici: rispettivamente il 97,8%, il 61% e il 25,8% dei ceppi sono risultati infatti insensibili a queste molecole. Dati più confortanti riguardano invece *S. pneumoniae*, *S. aureus* meticillino-resistenti e *P. aeruginosa* per i quali, in genere, il *trend* sembra stabile o in miglioramento per la maggior parte degli antimicrobici testati (ISTISAN 10/37, 2010; ECDC, 2011).

Inoltre, in linea con i dati evidenziati a livello europeo nella recente relazione congiunta dell'EFSA e dell'ECDC, dal rapporto dell'attività di sorveglianza delle infezioni enteriche nel periodo compreso tra il 2007 e il 2009 di Enter-net e nella relazione congiunta EFSA-ECDC sono state riscontrate resistenze particolarmente elevate anche in ceppi di *Salmonella* spp. (in particolare *S. Typhimurium*) e *Campylobacter* spp. isolati da casi clinici umani di salmonellosi e campilobatteriosi. In particolare, il 52-60% dei ceppi di *Salmonella* spp. ha mostrato resistenza nei confronti delle tetracicline, il 50-58% all'ampicillina, il 49-60% alla streptomina e il 48-64% ai sulfamidici con variazioni a seconda del periodo considerato, ma con un *trend* in costante aumento dal 2007 al 2010. Per quanto riguarda *Campylobacter* spp., è stato possibile osservare un'elevata percentuale di ceppi resistenti a chinoloni e fluorochinoloni (62%), mentre la percentuale di ceppi resistenti ai macrolidi si mantiene relativamente bassa (13,9%) (Dionisi *et al.*, 2011; EFSA and ECDC, 2012).

3.2 Negli animali e nelle derrate di origine animale

Dai dati riportati dall'EFSA e dall'ECDC nella recente relazione congiunta sull'antibiotico-resistenza riferita all'anno 2010 emerge che, stante le differenze sui livelli di resistenza alle singole molecole a seconda dello Stato Membro, questo fenomeno è largamente diffuso non soltanto nei patogeni isolati da casi umani di infezione ma anche in batteri, sia potenzialmente zoonotici che commensali, di origine animale. Per quanto concerne *Salmonella* spp. i dati più allarmanti riguardano le resistenze nei confronti delle tetracicline (75%), dei sulfamidici (64%) e dell'ampicillina (51%) soprattutto nei ceppi isolati da suini e bovini. Per quanto riguarda i fluorochinoloni quali la ciprofloxacina, il 28% dei ceppi di *Salmonella* spp. ha mostrato resistenza nei confronti di questa molecola, soprattutto i ceppi di origine avicola (tacchini, broiler e loro carni). Le resistenze riscontrate più di frequente in *Campylobacter* spp. isolati soprattutto da broiler, riguardano molecole quali l'acido nalidixico, la ciprofloxacina e le tetracicline, con percentuali variabili a seconda della specie e del Paese di origine. Livelli di resistenza più elevati a queste molecole sono stati riscontrati infatti in *C. coli* (rispettivamente del 76%, 84% e 73%) rispetto a *C. jejuni* (43% 47% 32%) sempre di origine avicola. Resistenze più contenute sono state invece rilevate nei confronti dell'eritromicina e della gentamicina dove più del 99% dei ceppi di *C. jejuni* e l'85-90% di *C. coli* isolati dal pollame sono risultati sensibili a queste molecole. Resistenze comunque importanti sono state riscontrate anche in ceppi di *Campylobacter* spp. isolati da suini e bovini, in particolare alle tetracicline e a chinoloni e fluorochinoloni.

Per quanto riguarda invece batteri commensali quali *E. coli*, le resistenze riscontrate con maggior frequenza riguardavano le tetracicline (31-48% dei ceppi a seconda della categoria di animali considerata), l'ampicillina (21-35%) e i sulfamidici (34-37%), con notevoli differenze tra i 10 Paesi dichiaranti (8 Paesi UE e 2 non UE). Per quanto riguarda invece l'acido nalidixico e la ciprofloxacina, le resistenze più elevate so-

no state evidenziate nei ceppi isolati da broiler, rispettivamente nel 26% e nel 29% dei ceppi testati. Tra gli enterococchi commensali, le resistenze più comuni erano rivolte a molecole quali l'eritromicina e le tetracicline, con percentuali variabili a seconda della specie considerata (*E. faecium* ed *E. faecalis*), della categoria di animali da cui sono stati isolati e dal Paese di origine. Per quanto riguarda le tetracicline, circa il 56-60% dei ceppi di *E. faecium/faecalis* isolati da broiler è risultato resistente a questa classe di molecole e il 47-56% all'eritromicina. Percentuali di resistenza simili sono state osservate anche nei ceppi di enterococchi isolati da suini, mentre livelli più contenuti negli isolati da bovini (EFSA and ECDC, 2012).

Per quanto riguarda l'Italia, nell'anno 2010 i dati più preoccupanti riguardano, per quanto concerne *Salmonella* spp., la resistenza riscontrata nei ceppi isolati da tacchini nei confronti delle tetracicline (96%), dell'ampicillina (88%) e dei sulfamidici (69%) mentre il 21-25% degli isolati da broiler ha mostrato resistenza nei confronti dell'acido nalidixico, della ciprofloxacina, dei sulfamidici, delle tetracicline e dell'ampicillina. Resistenze elevate sono state rilevate anche nei ceppi di *Salmonella* spp. di origine suina, in particolare nei confronti delle tetracicline (78%), sulfamidici (68%) e ampicillina (46%) (EFSA and ECDC, 2012).

Per quanto riguarda invece la diffusione dell'antibiotico-resistenza in ceppi di *Campylobacter* spp. di origine animale, in Italia gli ultimi dati risalgono al triennio 2007-2009 a seconda della categoria di animali inclusa nel monitoraggio. Per quanto riguarda le resistenze evidenziate in ceppi di *C. coli* isolati da broiler nel 2008, i dati più preoccupanti si riferiscono alle tetracicline nei confronti delle quali la quasi totalità dei ceppi è risultata resistente (96%), seguite dalla ciprofloxacina (89%), dall'acido nalidixico (70%) e dall'eritromicina (54%). Livelli di resistenza simili sono stati riscontrati anche nei ceppi di *C. jejuni* per quanto riguarda i chinoloni e fluorochinoloni, mentre resistenze più contenute sono state evidenziate nei confronti delle tetracicline (73%) e dell'eritromicina (7%) (EFSA, 2010b; EFSA, 2011).

Le informazioni più recenti sulla diffusione dell'antibiotico-resistenza in *Campylobacter* spp. isolati da suini e bovini invece risalgono rispettivamente al 2007 e 2009. Seppur con differenze a seconda della specie batterica e degli animali di origine, sono state evidenziate resistenze più contenute (anche se comunque preoccupanti) rispetto a quanto rilevato nei ceppi isolati dal pollame (EFSA, 2010b; EFSA, 2011).

Per quanto riguarda l'Italia, non sono disponibili informazioni recenti relative alle resistenze riscontrate in batteri indicatori quali *E. coli* ed *E. faecalis/faecium*. Gli ultimi dati risalgono infatti al 2007 e le resistenze più elevate riguardano *E. coli* isolati da broiler. Circa il 40% dei ceppi raccolti ha infatti mostrato resistenza ai sulfamidici e al cloramfenicolo, il 50% all'acido nalidixico e streptomina, il 70% alla tetraciclina e l'80% all'ampicillina. Percentuali elevate di resistenza sono state rilevate anche nei ceppi della stessa specie isolati dai suini, soprattutto nei confronti delle tetracicline (82%), mentre sono stati riscontrati livelli più contenuti nei confronti dell'acido nalidixico (17%). Non sono invece riportate informazioni per quanto riguarda gli enterococchi (EFSA, 2010a).

4. L'importanza del monitoraggio dell'antibiotico-resistenza nei batteri patogeni e commensali

Alla luce dell'importanza che i batteri antibiotico-resistenti di origine animale rappresentano per la salute pubblica, a destare particolare preoccupazione sono soprattutto le infezioni batteriche a carattere zoonotico. E' noto infatti che la maggior parte dei casi di infezioni umane sostenute da *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e da *E. coli* sono da imputare al consumo di alimenti contaminati di origine animale e, per questo motivo, l'UE ne promuove il monitoraggio ormai da diverso tempo. Tuttavia, negli ultimi anni, a destare particolare interesse è la progressiva diffusione di batteri commensali antibiotico-resistenti. Questi batteri infatti, pur non svolgendo un ruolo di primo piano poiché solo raramente sono responsabili di patologie nell'uomo e negli animali, possono fungere da *reservoir* di geni di resistenza alle molecole antimicrobiche, geni potenzialmente trasmissibili orizzontalmente anche a batteri patogeni (EFSA, 2008b).

Data quindi l'importanza del monitoraggio dell'antibiotico-resistenza sia nei batteri commensali che patogeni, *E. coli* può essere considerato un candidato ideale per comprendere le vie e i meccanismi di trasmissione e stimare la diffusione del fenomeno nell'ambiente. Infatti, *E. coli* è sia un componente del microbiota intestinale dei vertebrati, sia un patogeno responsabile di infezioni, anche gravi, nell'uomo e negli animali. Per questo motivo, il successo del trattamento farmacologico di infezioni sostenute da ceppi di *E. coli* antibiotico-resistenti, è certamente più a rischio in quanto questi microorganismi, soprattutto se multifarmaco-resistenti, sono potenzialmente più virulenti rispetto ai loro omologhi sensibili (von Baum *et al.*, 2005). Inoltre i ceppi resistenti, sia commensali che patogeni, presentano un vantaggio selettivo nei confronti di microorganismi sensibili in quanto hanno maggiori probabilità di colonizzare e persistere nell'intestino ospite (Barza *et al.*, 2002; von Baum *et*

al., 2005). La presenza quindi di batteri commensali antibiotico-resistenti quali possibili serbatoi di geni di resistenza trasmissibili ad altri microorganismi anche di diverse nicchie ecologiche, rappresenta certamente una grave minaccia per la sanità pubblica. Lo studio dell'antibiotico-resistenza in questi microorganismi è quindi particolarmente interessante poiché *E. coli*, essendo un batterio ubiquitario e quindi più diffuso rispetto ad altri microorganismi, è in grado di fornire importanti indicazioni sia sulla pressione selettiva esercitata dall'uso dei farmaci sulla normale flora intestinale, sia sulla diffusione trasversale del fenomeno nelle diverse nicchie ecologiche coinvolte (van den Bogaard *et al.*, 2000; EFSA and ECDC, 2012).

4.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli è un batterio gram negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Ampiamente diffuso in natura, può essere presente nel terreno e nell'acqua e, come indicato dal nome della famiglia di appartenenza, all'interno del tratto intestinale di uomini e animali. *E. coli* è normalmente presente nel tratto gastroenterico degli animali sin dalle prime ore di vita, rappresenta infatti uno dei microorganismi più diffusi quale componente essenziale della normale flora microbica intestinale nell'uomo e in molti animali e svolge un ruolo cardine nel mantenimento della fisiologia d'organo con importanti benefici per la salute dell'ospite. Rappresenta infatti il batterio anaerobio facoltativo maggiormente presente nel tratto intestinale dei mammiferi, soprattutto nel grosso intestino (Gyles *et al.*, 2004).

Nonostante la maggior parte dei ceppi di *E. coli* rimanga confinata nell'intestino senza essere responsabile di patologia per l'ospite, nel corso dell'evoluzione, alcuni ceppi hanno acquisito dei fattori di virulenza, passando così da batteri commensali a batteri patogeni. Alcuni ceppi di *E. coli* sono infatti responsabili di una vasta gamma di patologie intesti-

nali ed extra-intestinali sia nell'uomo che negli animali (Kaper *et al.*, 2004; Croxen and Finlay, 2010).

4.1.1 *E. coli* patogeno nell'uomo

Sulla base delle caratteristiche cliniche, i ceppi di *E. coli* responsabili di infezioni anche severe nell'uomo vengono distinti in patogeni intestinali e patogeni extraintestinali, questi ultimi associati spesso a infezioni addominali, al tratto urinario, polmoniti, meningiti, batteriemia e sepsi. (Russo and Johnson, 2000; Russo and Johnson, 2003).

I ceppi di *E. coli* patogeni sono tra gli agenti eziologici più comuni di infezione nell'uomo. Si stima che gli episodi di infezione sistemica sostenuti da questi batteri si aggirino intorno ai 30-60 casi/100.000 abitanti ogni anno e sono spesso associati ad un'elevata morbilità e mortalità (ECDC, 2011).

I ceppi che colpiscono il tratto intestinale sono principalmente responsabili di gastro-enteriti e, soprattutto quelli che presentano profili fenotipici di antibiotico-resistenza, sono spesso di origine alimentare (Johnson *et al.*, 2006; Collignon and Angulo, 2006). Questi batteri sono a loro volta suddivisi in categorie in base ai fattori di virulenza, ai meccanismi d'azione e alle manifestazioni cliniche. Esistono pertanto ceppi ETEC (enterotossigeni), EPEC (enteropatogeni), EAEC (enteroaggreganti), EIEC (enteroinvasivi), DAEC (diffusamente aderenti), EHEC (enteroemorragici) e VTEC (verocitotossici, sottogruppo di EHEC) (Maturana *et al.*, 2011).

I ceppi che destano maggior preoccupazione perchè responsabili di mortalità sono gli *E. coli* VTEC, in particolare il sierogruppo O157. Questi batteri sono infatti, dopo *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Yersinia* spp., gli agenti zoonotici di origine alimentare di maggior rilievo (EFSA and ECDC, 2012 food). I ceppi VTEC sono responsabili di forme gastro-enteriche particolarmente severe, anche emorragiche, che possono evolvere nella sindrome uremico-emolitica (Van Elsas *et al.*, 2011).

Per questo motivo, in accordo con la Normativa Europea (Dir. 2003/99/EC art. 9) sul monitoraggio delle zoonosi e degli agenti zoonotici, ogni Stato Membro è tenuto ad attuare sistemi di sorveglianza volti ad individuare quali animali e alimenti siano le principali fonti di infezione e a stimare la prevalenza dei focolai di infezione di origine alimentare (Dir. 2003/99/EC art. 9).

Nella recente relazione annuale dell'EFSA con l'ECDC sulle zoonosi e i focolai di origine alimentare nell'UE relativa al 2010, sono stati segnalati 4.000 casi umani di infezione da VTEC, con un incremento del 12,0% rispetto al 2009. Come riportato per gli anni precedenti, il sierogruppo riscontrato più di frequente era VTEC O157 (N = 1.501), con una diminuzione del 18,8% rispetto all'anno precedente (N = 1.848). Ad essere più colpiti dall'infezione, i bambini tra gli 0 e i 4 anni di età (4,7 casi per 100.000 abitanti), a cui sono stati associati i due terzi dei 222 casi (65,8%) di sindrome uremica emolitica, con un tasso di letalità dello 0,39% (EFSA and ECDC, 2012 food).

In Italia, dall'ultimo *report* sul monitoraggio di VTEC del 2010, si stima circa 30-40 casi di soggetti colpiti da sindrome uremico-emolitica ogni anno, con un'incidenza pari a 0,40 casi ogni 100.000 abitanti di età compresa tra gli 0 e i 14 anni. L'infezione, sostenuta principalmente dai sierogruppi O157 e O26, è stata spesso associata al consumo di latte crudo, pratica particolarmente diffusa in Italia negli ultimi anni grazie alla vendita diretta mediante *dispenser* automatici (EFSA, 2012).

Nonostante la prevalenza e il tasso di mortalità dovute a VTEC siano comunque limitate, la severità delle infezioni e lo sviluppo progressivo di resistenze spesso multiple in questi ceppi, tali da non rendere i trattamenti farmacologici efficaci, rappresentano un grave problema per la salute pubblica. In particolare negli ultimi anni stanno sempre più diffondendo ceppi patogeni, spesso di origine alimentare, resistenti ai farmaci d'elezione nel trattamento delle infezioni nell'uomo, in particolare cefalosporine di terza (e quarta) generazione e fluorochinoloni (ECDC, 2011). Sempre più preoccupante è infatti la diffusione di ceppi produt-

tori di β -lattamasi ad ampio spettro (ESBL), anche di origine avicola. Uno studio recente condotto in Giappone ha infatti evidenziato come il 78% dei ceppi di *E. coli* multi-resistenti isolati dal pollame fosse produttore di questi enzimi (Ho *et al.*, 2011).

4.1.2 *E. coli* patogeno nell'allevamento avicolo

La colibacillosi aviare è un'infezione localizzata o sistemica provocata da *E. coli*, batterio che, come già accennato nei paragrafi precedenti, è comunemente presente nella flora intestinale di varie specie animali, volatili compresi. Questo batterio è uno dei principali responsabili di danni economici per mortalità nell'allevamento avicolo di tutto il mondo. La colibacillosi è infatti l'infezione batterica più comune sia nell'allevamento del broiler che del tacchino (Lohren *et al.*, 2008). Tuttavia, nonostante esistano numerosi ceppi dotati di notevole patogenicità (*Avian Pathogenic E. coli* - APEC), negli avicoli non risulta che essi siano, salvo rare eccezioni, agenti primari di malattia ma piuttosto di patologie secondarie ad infezioni virali o ad errate pratiche di allevamento (Barnes *et al.*, 2008). La colibacillosi può dare luogo a setticemia, con conseguente morte degli animali, oppure può essere localizzata ed essere responsabile di onfalite nella prima settimana di vita e, nei soggetti adulti, di cellulite, sindrome della testa gonfia, enterite, salpingite o peritonite (Barnes *et al.*, 2003; Vaillancourt and Barnes, 2003). Ad oggi non è stato ancora possibile dimostrare che i ceppi APEC siano responsabili di tossinfezione alimentare nell'uomo. Tuttavia studi recenti hanno evidenziato somiglianze tra i fattori di virulenza dei ceppi APEC con gli *E. coli* responsabili di patologie extraintestinali umane. Non si può quindi escludere che alcuni APEC possano essere responsabili di patologie anche nell'uomo (Johnson *et al.*, 2003; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005).

Il controllo di tale patologia può essere affrontato eliminando o attenuando i fattori predisponenti, impedendo l'ingresso di *E. coli* patogeni negli allevamenti oppure controllando direttamente l'agente eziologico

mediante appropriati trattamenti farmacologici. Data la difficoltà nel controllo dei fattori predisponenti e scatenanti tale patologia, la terapia con antimicrobici e chemioterapici è certamente la via che più comunemente viene intrapresa negli allevamenti intensivi. Gli antimicrobici di prima scelta sono i sulfamidici potenziati, seguiti dalle aminopenicilline (ampicillina e amoxicillina), da alcuni aminoglicosidi (quali neomicina, gentamicina e apramicina) e dalla colistina nel caso di infezioni meno severe. Tuttavia, nonostante l'indubbia utilità nel controllo della colibacillosi e di altre forme batteriche, negli anni si è presa coscienza dei limiti che la terapia farmacologica può presentare a causa della progressiva selezione di batteri resistenti ad una vasta gamma di antimicrobici. La diffusione dell'antibiotico-resistenza in ceppi patogeni rappresenta una grave minaccia per l'allevamento intensivo in quanto il controllo delle infezioni sostenute da questi batteri è destinato a diventare sempre più difficile (Gyles, 2008a). In alcuni casi, infatti, è necessario il trattamento farmacologico con molecole diverse, quali i fluorochinoloni, a causa della resistenza sempre più diffusa alle molecole di prima e seconda scelta contro la colibacillosi (Lohren *et al.*, 2008).

4.1.3 *E. coli* patogeno nell'allevamento cunicolo

Per quanto riguarda l'allevamento del coniglio da carne, le principali cause di perdite economiche sono legate a patologie ad eziologia batterica, spesso associate ad infezioni sostenute da *K. pneumoniae* e da ceppi di *E. coli* enteropatogeni (EPEC). Questi patogeni sono spesso coinvolti in episodi di enterite con conseguenti forme di diarrea, perdita di peso ed elevate mortalità. Queste infezioni si verificano soprattutto nel momento più delicato per questi animali, ossia durante e dopo lo svezzamento (Blanco *et al.*, 1996). La virulenza dei ceppi EPEC sembra essere correlata alla presenza dei geni *eae* e *AF/R1* e *AF/R2*, codificanti rispettivamente per l'intimina e le fimbrie, elementi necessari affinché i batteri possano aderire agli enterociti in siti specifici e alterare il citoschele-

tro dell'epitelio intestinale così da comprometterne la funzionalità (Moon *et al.*, 1983; Pillien *et al.*, 1996; Penteado *et al.*, 2002; Urumova and Petrov, 2008).

La prevenzione e il controllo delle infezioni sostenute da questi enterobatteri è affidato principalmente ai trattamenti farmacologici attraverso mangimi medicati o mediante l'aggiunta di antimicrobici nell'acqua di bevanda. Diversamente da altre tipologie d'allevamento, infatti, l'allevamento del coniglio è, nella maggior parte dei casi, a ciclo chiuso. Molte realtà produttive sono organizzate in un capannone unico, dove sono presenti sia le fattrici che gli animali da ingrasso. Non essendo previsto quindi il vuoto sanitario, anche le normali prassi di pulizia e disinfezione degli ambienti sono di difficile esecuzione. Per questo, al fine di ridurre il più possibile la diffusione di patologie di difficile eradicazione, vengono spesso eseguite medicazioni a scopo preventivo con le stesse molecole utilizzate comunemente per la terapia ma a dosaggi più bassi. Tuttavia, negli ultimi anni, la diffusione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza si è manifestato anche nell'allevamento intensivo del coniglio da carne. La sempre più diffusa resistenza agli antimicrobici, insieme alle limitazioni imposte dalla legislazione in materia di utilizzo e somministrazione dei farmaci nelle produzioni animali, nonché la sensibilità dei conigli ad alcune molecole antibiotiche (soprattutto le penicilline), sono tutti fattori che non facilitano il controllo di queste patologie, tanto da rappresentare ancora oggi una delle cause principali di mortalità in allevamento (Moyenuddin *et al.*, 1989; Camarda *et al.*, 2004).

5. Meccanismi naturali e acquisiti di antibiotico-resistenza

La progressiva perdita di efficacia della terapia farmacologica sia in medicina umana che veterinaria è legata principalmente alla capacità dei batteri di rispondere ai nuovi stimoli ambientali tra cui l'esposizione a molecole antimicrobiche. I batteri sono infatti in grado di sviluppare efficacemente sempre nuove strategie evolutive che garantiscano loro di sopravvivere e di adattarsi in nicchie ambientali in continuo cambiamento e, per questo motivo, la pressione esercitata dai farmaci favorisce la comparsa e la diffusione della resistenza (Falagas and Bliziotis, 2007). A questo proposito, si distinguono diversi meccanismi mediante i quali i batteri possono sviluppare resistenza. Alcuni microorganismi sono naturalmente resistenti ad una o più classi di molecole grazie alle loro caratteristiche intrinseche e, in questo caso, tutti i batteri appartenenti alla stessa specie sono resistenti oppure possono acquisirne successivamente di nuove non proprie del genere o della specie d'appartenenza. I principali meccanismi mediante i quali i batteri sviluppano resistenza agli antimicrobici sono: i) modificazioni a livello di permeabilità di membrana della cellula batterica mediante l'espressione di proteine di membrana con scarsa affinità per la molecola antimicrobica tali da impedire (o ridurre) la possibilità che le molecole antimicrobiche raggiungano il proprio sito *target*; ii) modificazione del sito *target* o sua sovra-espressione; iii) inattivazione della molecola antimicrobica mediante l'acquisizione di geni codificanti enzimi quali β -lattamasi, adenil-transferasi o acetil-transferasi in grado di idrolizzare, adenilare o acetilare la molecola antimicrobica prima che possa esercitare la propria attività antibatterica; iv) presenza di pompe di efflusso energia-dipendenti, talvolta codificate da geni localizzati a livello plasmidico, che promuovono il trasporto attivo dell'antimicrobico all'esterno della cellula

impedendone l'accumulo (Spratt, 1994; McDermott *et al.*, 2003; Magnet and Blanchard, 2005; Wright, 2005).

Non di rado lo stesso batterio può presentare più di un meccanismo di resistenza. In alcuni casi il meccanismo di resistenza viene espresso costantemente anche se, di solito, i batteri sono in grado di modulare l'espressione dei geni di resistenza in base alle necessità e quindi in base alla presenza o meno delle molecole antimicrobiche nell'ambiente.

Per quanto riguarda la resistenza intrinseca, essa si riferisce normalmente alle caratteristiche biochimiche e fisiologico-strutturali che i microrganismi possiedono naturalmente. In generale, questa tipologia di resistenza è legata alla mancanza dei siti bersaglio su cui le molecole antimicrobiche agiscono, oppure alla bassa permeabilità della parete cellulare a queste molecole in virtù delle loro proprietà chimiche. Quest'ultima tipologia di resistenza si verifica soprattutto per quei farmaci che necessariamente devono penetrare nella cellula batterica per poter esercitare la propria attività (Byarugaba, 2009).

La resistenza acquisita invece si riferisce alla capacità di una popolazione inizialmente sensibile, di diventare resistente all'azione antimicrobica esercitata dal farmaco e di diffondere così nell'ambiente sotto la pressione selettiva esercitata dall'utilizzo di queste molecole. A questa tipologia si riferiscono sia resistenze endogene, legate prevalentemente a mutazioni nucleotidiche a livello cromosomico, sia resistenze esogene acquisite mediante lo scambio di materiale genetico che si può verificare tra microrganismi anche di genere o specie diversi (Ochman *et al.*, 2000; Carattoli, 2001; Rice *et al.*, 2003).

Le mutazioni che i batteri acquisiscono a livello cromosomico sono normalmente mutazioni spontanee del tutto casuali che si verificano nelle popolazioni batteriche con una frequenza bassa ma costante. Esse possono essere responsabili di resistenze legate i) ad alterazioni a livello della proteina bersaglio cui si lega il farmaco mediante mutazioni a livello del sito di legame, ii) alla sovra-espressione di enzimi che inattivano la molecola antimicrobica, iii) ad alterazioni a livello delle proteine di

membrana necessarie affinché la molecola possa entrare nella cellula batterica e raggiungere il proprio sito *target*, oppure iii) all'espressione di pompe di efflusso in grado di promuovere l'estrusione del farmaco dalla cellula. Questa tipologia di resistenza viene trasmessa verticalmente all'interno dello stesso clone batterico dalla cellula madre alle cellule figlie che, in presenza di antimicrobici verso i quali la presenza di mutazioni conferisce resistenza, sono in grado di sopravvivere, crescere e diffondere. Questi meccanismi sono stati spesso associati allo sviluppo di resistenze a diverse classi e molecole antimicrobiche quali macrolidi, chinoloni, sulfamidici, streptomycina e trimethoprim (Hooper, 2000; Ruiz, 2003).

Tuttavia, ad accelerare notevolmente l'evoluzione e a destare maggior preoccupazione è soprattutto la resistenza di tipo esogeno, legata principalmente alla capacità dei batteri di scambiarsi orizzontalmente materiale genetico. Il trasferimento genico è infatti un importante strumento, sia da un punto di vista evolutivo che di adattamento dei microrganismi alle mutevoli condizioni ambientali. Questo tipo di trasferimento consente infatti ai batteri di acquisire nuovi geni da altri microorganismi e di esprimerli acquisendo così capacità di sopravvivere in condizioni prima letali (Carattoli, 2003; Perry *et al.*, 2004).

I batteri possono acquisire nuovi geni, ossia frammenti di DNA eterologo, attraverso tre diversi meccanismi:

- i) la *trasformazione*, mediante la quale una cellula batterica competente può acquisire molecole di DNA libere presenti nell'ambiente. Tuttavia, affinché si verifichi, questo meccanismo richiede un dispendio energetico da parte della cellula batterica e la sua capacità di accettare DNA esogeno dipende da diversi fattori quali la fase della divisione cellulare e la condizione fisiologica in cui essa si trova (McCarty, *et al.*, 1946). Questo fenomeno è quindi particolarmente raro in natura, tant'è che il trasferimento di geni di resistenza agli antimicrobici è stato verificato soltanto in alcune specie di *Streptococcus*

spp. e *Neisseria* spp. (Mazel, 2001). Questo meccanismo viene invece comunemente sfruttato nei laboratori di biologia molecolare per il trasferimento di materiale genetico *in vitro* tra batteri.

- ii) la *trasduzione*, meccanismo che consiste nel trasferimento di DNA da un batterio ad un altro mediante batteriofagi. Si verifica a seguito di un errore durante il ciclo litico del fago in cui vengono incorporati erroneamente tratti di genoma batterico. Se ad essere inglobato è un gene di resistenza agli antimicrobici, questo può essere trasferito ad un'altra cellula batterica come conseguenza dell'infezione mediata dallo stesso fago. Stante sia stato dimostrato come alcuni batteri siano sensibili all'infezione da fagi, ad oggi non è ancora stata chiarita la reale importanza di questo meccanismo nella diffusione dell'antibiotico-resistenza nella popolazione batterica (Klare *et al.*, 2001).
- iii) la *coniugazione*, meccanismo che prevede il trasferimento di porzioni di DNA da una cellula donatrice ad una ricevente mediante contatto diretto. Il materiale genetico trasferibile, che si trova libero nel citoplasma della cellula donatrice, è detto plasmide. Poiché i plasmidi possono veicolare più geni di resistenza agli antimicrobici, questi possono essere trasferiti contemporaneamente da un batterio ad un altro, anche di specie diversa (McManus, 1997; Perry *et al.*, 2004).

Dei tre meccanismi appena descritti, quello certamente più efficace e che si verifica più comunemente in natura, soprattutto per quanto riguarda il trasferimento di geni di resistenza agli antimicrobici, è certamente la coniugazione. Molto spesso infatti, batteri che mostrano profili di multifarmaco-resistenza presentano plasmidi coniugativi nel loro corredo genetico (Carattoli, 2003, Carattoli, 2009). I plasmidi sono infatti piccole molecole di DNA del tutto indipendenti dal cromosoma batterico

e, diversamente da quest'ultimo, sono facilmente trasferiti da un microorganismo all'altro. Inoltre, la presenza di geni di resistenza per diverse molecole antimicrobiche su uno stesso plasmide, spesso sotto forma di integroni e/o trasposoni, permette il trasferimento e l'acquisizione di resistenze multiple da ceppi resistenti a ceppi sensibili (Carattoli, 2001; Carattoli, 2003; Van Essen-Zandbergen *et al.*, 2007).

5.1 Strutture genetiche coinvolte nel trasferimento orizzontale dell'antibiotico-resistenza

L'antibiotico-resistenza è il risultato di un complesso processo multifattoriale supportato da una serie di elementi genetici mobili capaci di veicolare e trasferire determinanti di resistenza. Il trasferimento orizzontale di materiale genetico tra batteri è un fenomeno particolarmente diffuso e piuttosto comune nell'ecologia dei batteri, soprattutto nei batteri gram-negativi (Stokes and Hall, 1989; Martinez and de la Cruz, 1990).

Come accennato nel paragrafo precedente, esistono diverse strutture genetiche spesso tra loro correlate, in grado di promuovere l'acquisizione e il trasferimento di *cluster* di geni di resistenza agli antimicrobici tra batteri, in particolare plasmidi, trasposoni ed integroni (Carattoli, 2001). Queste strutture infatti sono in grado di acquisire ed esprimere contemporaneamente geni di resistenza a diverse molecole antimicrobiche e, se mobili o localizzate a livello di elementi di DNA trasferibili, diffondere da un microorganismo all'altro anche se di specie o genere diversi (Carattoli, 2003; Courvalin, 2008).

5.1.1 Gli integroni

La presenza di geni di resistenza agli antimicrobici a livello plasmidico è spesso legata alla presenza di integroni, strutture genetiche in grado di acquisire, integrare ed esprimere geni contenuti in cassette mobili, definiti geni-cassetta. Ad oggi sono state descritte molte cassette geniche codificanti resistenze verso diversi antimicrobici, in particolare amino-

glicosidi, β -lattamici, trimethoprim e cloramfenicolo (Rowe-Magnus and Mazel, 2002; Fluit and Schmitz, 2004; Mazel, 2006).

Queste cassette possono esistere nella cellula batterica in forma libera, come molecole circolari, e possono essere espresse solo dopo essere state acquisite e inserite all'interno dell'integrone (Carattoli, 2001).

Queste strutture contengono sostanzialmente tre componenti funzionali: i) il gene *intI*, che codifica per un enzima, l'integrasi, facente parte della famiglia delle tirosin-ricombinasi sito-specifiche che catalizza l'inserimento delle cassette geniche nel ii) sito di ricombinazione *attI*, e iii) un promotore responsabile dell'espressione dei geni-cassetta inseriti (Carattoli, 2001; Collis *et al.*, 2002; Madiyarov *et al.*, 2010).

In base alla sequenza del gene *intI* codificante per l'integrasi, si distinguono diverse classi di integroni, caratterizzate da differenze sia da un punto di vista strutturale che funzionale. Tuttavia, le classi più diffuse e meglio caratterizzate sono le prime due e sembrano essere quelle maggiormente coinvolte nella diffusione dell'antibiotico-resistenza sia nei batteri gram-positivi che gram-negativi (Recchia and Hall, 1995; Nesvera *et al.*, 1998; Carattoli, 2001; Nandi *et al.*, 2004; Mazel, 2006).

Nelle *Enterobacteriaceae*, la classe 1 è certamente la più diffusa ed è caratterizzata dalla presenza di due segmenti conservati alle estremità (CS5' e CS3'), rispettivamente di 1.4 e 5 kb circa, e da una regione variabile contenente una o più cassette geniche responsabili della resistenza agli antimicrobici (Hall *et al.*, 1991).

La regione conservata CS5' contiene i) il gene *intI* codificante per l'integrasi, un enzima responsabile dell'inserimento ed escissione delle cassette geniche a livello del sito di ricombinazione, ii) il sito di ricombinazione *attI*, di circa 40-70 pb e iii) il promotore *P1*, responsabile della trascrizione delle cassette geniche. Talvolta è possibile riscontrare la presenza anche di un altro promotore, il promotore *P2*, tuttavia privo di attività (Stokes and Hall, 1989; Collis and Hall, 1995; Fluit and Schmitz, 2004).

Nella regione conservata CS3' sono invece presenti i) il gene *qacEΔ1*, responsabile della resistenza ai composti dell'ammonio quaternario, utilizzati spesso come disinfettanti, ii) il gene *sulI*, codificante per la resistenza ai sulfamidici e iii) e un'*Open Reading Frame* (ORF5), la cui funzione è tuttavia ancora sconosciuta (Carattoli, 2001).

Le cassette geniche che conferiscono resistenza agli antimicrobici si trovano nella regione variabile compresa tra le due regioni conservate. Esse vengono definite come unità discrete di DNA circolare variabili sia per dimensione che funzione. Ad oggi sono state descritte più di 130 cassette diverse, in grado di conferire resistenza a quasi tutte le classi di antimicrobici (Barraud *et al.*, 2010). Nonostante possano presentare dimensioni variabili, la struttura è comune e si compone di un singolo gene adiacente ad un sito specifico di ricombinazione *attC* di 57-141 bp (White *et al.*, 2001). Alle estremità del sito *attC* si riconoscono due sequenze ripetute ed invertite, GTTRRRY e RYYAAC, dove R è una purina e Y una pirimidina (Recchia and Hall, 1995; Ploy *et al.*, 2000a). Tuttavia, poiché nella maggior parte dei casi le cassette geniche sono prive di promotore, non possono essere trascritte senza essere prima inserite all'interno dell'integrone e il loro livello di espressione varia a seconda della loro localizzazione. Infatti, più i geni sono situati in prossimità del promotore e maggiore è la loro espressione (Collis and Hall, 1995; Carattoli, 2001). Inoltre, al fine di migliorare l'espressione genica, la pressione selettiva esercitata dall'uso degli antimicrobici può facilitare degli arrangiamenti tali da consentire che una cassetta debolmente espressa possa essere localizzata in una posizione vicina al promotore (Collis and Hall, 1995). I determinanti genici più diffusi sono le varianti dei geni *aadA* e *dfr* che conferiscono rispettivamente resistenza agli aminoglicosidi, come la streptomicina e la spectinomycin, e al trimethoprim (Fluit and Schmitz, 2004).

Inoltre, gli integroni appartenenti a questa classe sono spesso associati a trasposoni Tn21 (Radstrom *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1996).

Gli integroni di classe 2 sono invece strutture che si riscontrano meno frequentemente rispetto agli integroni di classe 1 e sono spesso associati ai trasposoni Tn7 e derivati (Radstrom *et al.*, 1994; Hall and Collis, 1995; Ploy *et al.*, 2000b). Per quanto riguarda la struttura, gli integroni di classe 2 sono caratterizzati da un gene codificante l'integrasi, *IntI2*, che presenta un'omologia di sequenza di circa 40-60% con il gene codificante per l'integrasi di classe 1. Questo gene risulta difettivo per la presenza, all'interno della sequenza, di un codone di stop. E' infatti presente una mutazione a livello del codone 179 responsabile della sintesi di una proteina tronca poco funzionale (Hansson *et al.*, 2002; Mazel, 2006). Infatti, ad oggi, il numero e la tipologia delle cassette geniche riscontrate in queste strutture è particolarmente limitata ed è riconducibile ad una ridotta capacità dell'integrasi nel catalizzare la loro inserzione nel sito di ricombinazione (Biskri and Mazel, 2003; Ramirez *et al.*, 2005; Mazel, 2006). La combinazione genica riscontrata più di frequente è la combinazione dei geni *dfr*, *sat* e *aadA*, responsabili rispettivamente della resistenza al trimethoprim (*dfr*), alla streptotricina (*sat*), streptomina e spectinomina (*aadA*). Come già accennato, gli integroni di classe 2 sono spesso correlati ai trasposoni Tn7 e presentano nella regione CS3' 5 geni *tns* essenziali perché avvenga la trasposizione. In particolare, *tnsA*, *B* e *C* codificano per proteine regolatorie, mentre *tnsD* e *tnsE* promuovono l'inserzione della struttura a livello cromosomico o plasmidico (Flores *et al.*, 1990; Kubo and Craig, 1990; Ploy *et al.*, 2000b; Peters and Craig, 2001).

E' quindi chiaro che gli integroni in quanto tali non sono elementi mobili, ma possono essere veicolati da plasmidi e trasposoni e acquisire così la capacità di muoversi per coniugazione o trasposizione (Fluit and Schmitz, 2004).

5.1.2 I trasposoni

I trasposoni sono una classe di sequenze mobili di DNA particolarmente eterogenea e diffusa nel genoma dei procarioti. Queste strutture sono capaci di trasporre da una posizione all'altra del genoma, dal genoma ai plasmidi, da un plasmide ad un altro e viceversa, grazie alla presenza di sequenze ripetute e invertite presenti alle loro estremità. La forma più semplice di questa struttura è la sequenza di inserzione, IS. Nei batteri sono state riscontrate diverse IS, con dimensioni che variano da poche centinaia a diverse migliaia di basi. Normalmente, ogni IS contiene un gene codificante per un enzima responsabile della trasposizione, chiamato trasposasi. Questo enzima promuove la ricombinazione sito-specifica durante la trasposizione, evento che può verificarsi mediante l'escissione e la successiva integrazione della struttura in un sito diverso oppure, la stessa, può essere replicata e la sua copia inserita in una posizione diversa del genoma batterico (Mahillon *et al.*, 1999; Carattoli, 2001; Perry *et al.*, 2004; Frost, 2005; Harbottle *et al.*, 2006).

I trasposoni possono tuttavia presentare una struttura particolarmente complessa, come nel caso dei trasposoni composti, ed è stato dimostrato come essi giochino un ruolo chiave nella diffusione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza. Infatti, molti determinanti di resistenza agli antimicrobici in diverse specie batteriche sono trasmessi proprio mediante queste strutture, tanto da essere considerate pericolosi mediatori di diffusione di questo fenomeno nella popolazione batterica (Mahillon *et al.*, 1999; Salyers and Amabile-Cuevas, 1997; Perry *et al.*, 2004; Harbottle *et al.*, 2006).

Infatti, oltre ad una loro possibile localizzazione a livello plasmidico, esistono trasposoni, definiti trasposoni coniugativi o CONSTINs (*conjugative, self-transmissible integrative elements*) in grado di trasferirsi autonomamente da una cellula ad un'altra mediante coniugazione (Hochhut and Waldor, 1999; Pembroke and Murphy, 2000).

5.1.3 I plasmidi

I plasmidi sono molecole di DNA extra-cromosomico a doppio filamento circolare capaci di replicare autonomamente rispetto al genoma batterico. Spesso la loro presenza influenza notevolmente la cellula batterica ospite da un punto di vista biologico. Queste strutture sono molto variabili, sia per dimensione (da poche centinaia a diverse migliaia di basi) che per numero di copie presenti all'interno della cellula batterica (Reanney, 1976; Campbell, 1981; Perry *et al.*, 2004).

I plasmidi sono elementi particolarmente diffusi soprattutto nei procari, anche se la loro presenza è stata riscontrata anche in alcuni eucarioti primitivi quali il lievito ed alcuni funghi (Rush and Misra, 1985).

Oltre ad essere garantita la replicazione autonoma, queste strutture presentano diversi geni necessari per il loro trasferimento (tra cui i geni codificanti le proteine del pilo e quelli correlati alla regolazione della sua espressione e formazione) e per il controllo sia per quanto riguarda il numero di copie presenti nella cellula ospite, sia per la loro perpetuazione durante la divisione cellulare. I plasmidi, anche se non tutti, possono essere trasferiti orizzontalmente da una cellula a un'altra mediante il processo di coniugazione e, sebbene normalmente solo batteri appartenenti allo stesso genere siano in grado di scambiarsi materiale genetico, esistono plasmidi definiti *promiscui* capaci di essere trasferiti e acquisiti da batteri di genere e specie diversi (Perry, 2004; Carattoli, 2009).

Per definizione, i plasmidi presenti in natura si sono evoluti come parte integrante del corredo genomico batterico e giocano un ruolo importantissimo da un punto di vista evolutivo grazie alla loro capacità di acquisire e trasferire orizzontalmente geni tra batteri (Frost *et al.*, 2005; Carattoli, 2009). Tuttavia queste strutture solitamente non veicolano geni indispensabili alla crescita dei batteri ma conferiscono loro alcune proprietà e funzioni accessorie come i determinanti di virulenza e i geni di resistenza agli antimicrobici, spesso associati a trasposoni e integroni,

tali da conferire un vantaggio facilmente selezionabile in particolari condizioni o nicchie ecologiche (Thomas and Nielsen, 2005). Tuttavia, nell'ecologia batterica la presenza di plasmidi rappresenta un costo da un punto di vista biologico per la cellula ospite. Pertanto, qualora il plasmide non dovesse apportare un vantaggio, questo viene eliminato dalla popolazione (Lensky, 1998; Thomas and Nielsen, 2005).

I plasmidi possono essere distinti in base al vantaggio selettivo legato ai geni che veicolano e un gruppo particolarmente importante sono i plasmidi R, ossia i plasmidi coinvolti nella diffusione dell'antibiotico-resistenza. Fin dalla loro scoperta, avvenuta durante gli anni '50 e '60, i plasmidi R hanno destato particolare interesse nei genetisti di tutto il mondo, essendo in grado di conferire alla popolazione batterica un vantaggio sotto la pressione selettiva esercitata dagli antimicrobici (Watanabe, 1963; Watanabe, 1969).

Poiché queste strutture sono state spesso riscontrate sia in batteri patogeni che commensali, gram-positivi e gram-negativi, il pericolo legato alla loro diffusione è aggravato dalla possibilità che i geni responsabili di resistenza agli antimicrobici vengano trasferiti anche tra batteri di genere e specie diversi. I geni con localizzazione plasmidica possono infatti essere trasferiti da un batterio ad un altro e conferire così a quest'ultimo caratteristiche fenotipiche di cui era sprovvisto. Inoltre, una volta che tali determinanti sono stati selezionati nella cellula batterica ospite, essi possono evolvere ulteriormente ed essere trasferiti ad altri batteri. Se infatti *E. coli*, normale componente del microbiota intestinale umano e animale, veicola queste strutture, può facilmente trasmettere geni di resistenza ad altri batteri, anche patogeni (Winn *et al.*, 2009). Inoltre, se il numero di copie di uno stesso plasmide è considerevole all'interno della cellula ospite, maggiore sarà l'espressione dei geni che veicola e di conseguenza, nel caso di plasmidi R, anche la resistenza agli antimicrobici sarà più elevata.

Dato il ruolo cruciale che i plasmidi rivestono da un punto di vista evolutivo, in particolare nella diffusione di geni di virulenza e di antibiotico-

resistenza nella popolazione microbica, è di fondamentale importanza una loro corretta classificazione tale da consentirne l'individuazione ed avere informazioni in merito alla loro distribuzione, diffusione ed evoluzione in natura anche in relazione con la cellula batterica ospite (Carattoli, 2009; Carattoli, 2011).

5.1.4 Classificazione dei plasmidi

I plasmidi vengono classificati in gruppi di incompatibilità (*Inc-group*), dove per *incompatibilità* si intende l'incapacità di due plasmidi filogeneticamente correlati di essere propagati stabilmente nella stessa linea cellulare. L'incompatibilità tra plasmidi è un fenomeno di notevole importanza, soprattutto per quanto riguarda lo studio dell'evoluzione e dell'ecologia di queste strutture. Quando un plasmide si inserisce in una cellula batterica che ne possiede un altro che condivide la stessa origine di replicazione (*rep*), il secondo plasmide non può essere mantenuto stabilmente e viene quindi perso nel successivo ciclo di replicazione cellulare. In questo caso i due plasmidi si definiscono incompatibili (Novick, 1987).

Inizialmente, Datta e Hedges nel 1971 proposero uno schema di classificazione basato sulla stabilità dei plasmidi durante la coniugazione: questo metodo prevede il trasferimento di un plasmide in una cellula batterica che già ne possiede un altro e ciò che viene valutato è la stabilità con cui entrambi i plasmidi vengono mantenuti nella progenie (Datta and Hedges, 1971). Tuttavia questo metodo risulta particolarmente lungo e laborioso e per questo può essere applicato su un numero limitato di ceppi batterici. Nel 1988, Couturier e colleghi svilupparono un metodo di tipizzazione molecolare basato sull'identificazione dei repliconi mediante saggi di ibridazione a DNA (Couturier *et al.*, 1988). Tuttavia anche questa metodica presentava dei limiti, soprattutto in termini di specificità. Per questi motivi, nel 2005 Carattoli e colleghi svilupparono un nuovo metodo basato su reazioni di *Polimerase Chain Reaction (PCR)*

based replicon typing - PBRT) per l'identificazione delle principali famiglie di plasmidi circolanti tra le *Enterobacteriaceae*. Questo metodo consente di classificare i plasmidi nei principali *inc-group* HI1, HI2, I1-Iy, X, L/M, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, A/C, T, FIIAs, F, K, B/O e successivamente anche R, U e colE, sulla base delle differenze nucleotidiche delle sequenze del gene codificante per le replicasi (Carattoli *et al.*, 2005; Garcia-Fernandez *et al.*, 2009).

Ad oggi sono stati individuati 27 *inc-group* nella famiglia delle *Enterobacteriaceae* ed *E. coli* è una delle specie in cui è stata riscontrata una variabilità più elevata (Carattoli, 2009; Villa *et al.*, 2010; DebRoy, *et al.*, 2010; Johnoson *et al.*, 2010; Carattoli, 2011).

E' tuttavia necessario sottolineare che anche questa metodica presenta dei limiti, legati soprattutto alla possibilità di individuare solo plasmidi appartenenti ai principali *inc-group* conosciuti ad oggi senza poter identificarne di nuovi (Carattoli, 2009). Ciononostante, la PBRT rappresenta certamente una svolta per quanto riguarda le conoscenze sulla diffusione delle principali famiglie plasmidiche circolanti nei batteri enterici. Questa metodica consente inoltre di valutare la correlazione tra la presenza di particolari *inc-group* e la diffusione di determinanti genici di virulenza e di antibiotico-resistenza, in particolare alle principali molecole di rilevanza clinica quali cefalosporine, aminoglicosidi e fluorochinoloni (Carattoli *et al.*, 2006; Carattoli, 2009).

6. I chinoloni e i fluorochinoloni

I chinoloni e i fluorochinoloni sono tra gli antimicrobici più utilizzati per il trattamento delle infezioni sia in medicina umana che veterinaria e per questo di particolare interesse sia per la salute pubblica che animale (EMA, 2007). Il primo chinolone, l'acido nalidixico, è stato introdotto nella pratica clinica umana nel 1962 mentre la ciprofloxacina, particolarmente efficace contro i batteri gram-negativi, è il più utilizzato tra i fluorochinoloni ed è stato introdotto nella metà degli anni '80 (Paton and Reeves, 1988). Da allora, sono state sviluppate nuove molecole particolarmente efficaci sia contro i patogeni gram-negativi che gram-positivi, anche se la più indicata contro i batteri gram-negativi sembra essere ancora la ciprofloxacina (Hooper, 2005).

L'introduzione dei primi chinoloni per il trattamento delle infezioni negli animali da reddito (l'acido oxalinico e la flumechina) risale invece agli inizi degli anni '80, mentre l'enrofloxacin tra la fine degli anni '80 e i primi anni '90 (EMA, 2007).

Negli ultimi decenni, l'efficacia di queste molecole è andata man mano riducendosi a causa della comparsa e progressiva diffusione di batteri resistenti non necessariamente correlati filogeneticamente tra loro. Ciò è indicativo di come il fenomeno della resistenza a queste molecole emerga, nei vari casi, in modo del tutto indipendente (Strahilevitz *et al.*, 2009).

A destare particolare preoccupazione è la diffusione della resistenza a questa classe di molecole non soltanto in patogeni responsabili di infezioni nosocomiali e di comunità nell'uomo (*P. aeruginosa*, *S. aureus* meticillino-resistenti e *S. pneumoniae*) legata principalmente all'uso di questi farmaci in medicina umana, ma anche in batteri potenzialmente zoonotici di origine animale. E' stata infatti ampiamente documentata la correlazione tra l'utilizzo di questi farmaci nelle produzioni animali e i casi di infezione alimentare nell'uomo sostenuti da ceppi di *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. antibiotico-resistenti. Il primo studio ad

aver riscontrato un progressivo aumento della resistenza ai fluorochinoloni in ceppi di *Campylobacter* spp. a seguito dell'introduzione dell'enrofloxacin come medicamento nell'acqua di abbeverata negli allevamenti avicoli intensivi, risale al 1991 nei Paesi Bassi. Endtz e colleghi avevano infatti evidenziato con uno studio retrospettivo come nei quattro anni precedenti all'introduzione dei fluorochinoloni nelle produzioni avicole, la resistenza a questa classe di molecole fosse assente in *Campylobacter* spp. (Endtz *et al.*, 1991). A questo studio ne seguirono molti altri in diversi Paesi del mondo, a sostegno della correlazione tra il progressivo aumento della resistenza a queste molecole nelle *Enterobacteriaceae* e il loro utilizzo negli allevamenti intensivi (Threlfall *et al.*, 1997; Engberg *et al.*, 2001; Lucey *et al.*, 2002; Marimon *et al.*, 2004; Guerri Santos and Rotger, 2004; Hsueh *et al.*, 2004). Questi dati sono particolarmente allarmanti poiché i fluorochinoloni sono considerati molecole di prima scelta nella terapia della salmonellosi e come alternativa ai macrolidi per il trattamento della campilobatteriosi nell'uomo. E' quindi chiaro che la progressiva perdita di efficacia dei trattamenti farmacologici ai principali patogeni enterici umani rappresenta una vera minaccia per la salute pubblica. E' inoltre importante ricordare che, anche in ambito veterinario, la diffusione di batteri patogeni con profili di resistenza ai fluorochinoloni rappresenta un problema a causa delle ingenti perdite economiche dovute all'inefficacia dei trattamenti farmacologici. Infatti, da un lato il numero limitato di molecole autorizzate, dall'altro la sempre più diffusa presenza di batteri resistenti alle principali molecole il cui utilizzo è consentito, rende sempre più difficile la terapia delle infezioni anche nelle produzioni animali (EMA, 2007). Ampiamente documentata è la sempre più diffusa resistenza in *E. coli* alle principali classi di molecole quali tetracicline, sulfamidici e β -lattamici. Questa specie batterica, oltre ad essere responsabile di infezioni anche severe nell'uomo, è la principale causa di perdite economiche dovute a colisetticemia nel settore avicolo e, in questi casi, come nelle forme di diarrea neonatale nei suinetti e nei vitelli, la terapia con i fluorochinolo-

ni è pressoché indispensabile (Blanco *et al.*, 1997; Bass *et al.*, 1999; Prescott *et al.*, 2000; Gyles, 2008a; Lohren *et al.*, 2008).

6.1 Modalità d'azione e meccanismi di resistenza

I fluorochinoloni sono gli unici antimicrobici utilizzati nella pratica clinica che agiscono come inibitori diretti della sintesi del DNA. Questa classe, anche se con affinità diverse a seconda della molecola, inibisce l'azione della DNA girasi e della topoisomerasi IV, due enzimi essenziali per la replicazione del DNA. DNA girasi e topoisomerasi IV sono due enzimi tetramerici con struttura molto simile anche se funzionalmente diversi: entrambi si compongono di 2 subunità A e 2 subunità B. L'interazione del farmaco con l'enzima impedisce la corretta replicazione del DNA con conseguente morte della cellula batterica (Drlica *et al.*, 2008).

Lo sviluppo di resistenze elevate a queste molecole sono riconducibili principalmente a mutazioni cromosomiche, spesso multiple, in particolari regioni denominate *Quinolone Resistance Determining Regions* (QRDR) della sequenza nucleotidica dei quattro geni codificanti per le rispettive subunità (*gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*), insieme a mutazioni a carico dei geni che regolano l'espressione delle pompe di efflusso e delle proteine di membrana aventi i chinoloni come substrato. Queste mutazioni sono quindi responsabili sia di alterazioni a livello dei siti *target* su cui normalmente queste molecole esplicano la loro azione, sia sulla permeabilità di membrana tali da impedire l'ingresso del farmaco nella cellula o promuoverne l'estrusione grazie ad una sovra-espressione delle pompe di efflusso naturalmente presenti (AcrAB-TolC in *E. coli*) (Hooper, 2001; Ruiz, 2003; Jacoby, 2005; Rodriguez-Martinez, 2011).

Tuttavia, ricondurre lo sviluppo di resistenze clinicamente rilevanti esclusivamente ad un accumulo di mutazioni spontanee a livello cromosomico, non è certamente una spiegazione esauriente. La possibilità infatti che si verifichino contemporaneamente due mutazioni, nella mag-

gior parte dei casi necessarie affinché si sviluppi una resistenza rilevante da un punto di vista clinico, è un evento genetico particolarmente raro (che si verifica con una frequenza di 10^{-14} - 10^{-16}) che non può spiegare da solo la rapidità con cui sta diffondendosi la resistenza a queste molecole nella popolazione batterica (Zhao *et al.*, 1997; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodriguez-Martinez, 2011).

La scoperta della presenza a livello plasmidico dei geni PMQR (*Plasmid Mediated Quinolone Resistance*), responsabili di una ridotta sensibilità a questa classe di molecole, ha certamente permesso di migliorare la comprensione della diffusione di questo fenomeno nelle *Enterobacteriaceae*. La scoperta del primo determinante PMQR risale al 1998 quando, in un ceppo di *K. pneumoniae*, era stato identificato per la prima volta il primo gene *qnr* in un plasmide (Martinez-Martinez, 1998).

Da allora, oltre ai *qnr*, sono stati identificati altri geni a localizzazione prevalentemente plasmidica responsabili della diffusione della resistenza ai chinoloni e fluorochinoloni. Solo di recente è stata identificata per la prima volta una variante del gene codificante per l'enzima *aminoglycoside acetyl-transferase*, *aac(6')-Ib-cr*, responsabile di una ridotta sensibilità alla ciprofloxacina e i geni *qepA* e *oqxAB* codificanti per pompe di efflusso (Robicsek *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2008; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodriguez-Martinez, 2011; Poirel *et al.*, 2012).

I geni *qnr* (A, B, C, D, S e le loro varianti alleliche, disponibili all'indirizzo www.lahey.org/qnrStudies) codificano per delle proteine appartenenti alla *pentapeptide-repeat family* (PPR). Queste proteine sono in grado di proteggere i siti *target* (DNA girasi e topoisomerasi IV) riducendo la possibilità che si formi il complesso enzima-DNA-chinolone, letale per la cellula batterica (Baquirin and Barlow, 2008; Jacoby *et al.*, 2008). Inoltre, il rilievo di questi geni sia in batteri gram-negativi che positivi sia sensibili che resistenti a queste molecole, indica che la presenza di queste proteine può giocare un ruolo importante nell'acquisizione di mutazioni a livello cromosomico e quindi la comparsa, lo sviluppo e la diffusione di resistenze anche elevate (Dalhoff,

2012). Questo si verifica principalmente a seguito dell'induzione di un complesso sistema di modificazioni cellulari, noto come risposta SOS, come conseguenza dell'esposizione della cellula batterica ad un danno dovuto, per esempio, alla presenza delle molecole antimicrobiche. Poiché è stato dimostrato che il sistema SOS promuove l'espressione dei geni *qnrB* e *qnrD*, condizioni sfavorevoli tra cui la presenza di molecole antimicrobiche non necessariamente correlate ai fluorochinoloni, quali β -lattamici e trimethoprim, favoriscono l'espressione di questi geni (Lewin and Amies, 1991; Miller *et al.*, 2004; Da Re *et al.*, 2009). Inoltre è stato dimostrato in *E. coli* come questi meccanismi di adattamento del DNA ad un danno cellulare promuovano la de-repressione di geni i cui prodotti sono responsabili di tassi di mutazione genetica più elevati. Oltre alla selezione promossa dalla presenza di molecole antimicrobiche, anche i batteri in quanto tali sembrano quindi svolgere un ruolo attivo nell'acquisizione di mutazioni nel loro patrimonio genetico tali da conferire loro un vantaggio (Avison, 2005).

Inoltre, i geni *qnrA* e *qnrB* sono stati riscontrati di frequente in integroni veicolanti determinanti genici di resistenza ad altri antimicrobici, soprattutto β -lattamici e aminoglicosidi, mentre *qnrS* in trasposoni contenenti geni codificanti per le ESBL (Hernandez *et al.*, 2011). Di conseguenza, la presenza nelle stesse strutture di più geni di resistenza da un lato e dall'altro l'espressione dei geni *qnr* grazie all'attivazione dei sistemi SOS da parte di diversi antimicrobici, promuovono la selezione e la diffusione di ceppi resistenti o con ridotta sensibilità ai fluorochinoloni anche in assenza di una pressione selettiva esercitata da queste molecole.

Per quanto riguarda invece il gene *aac(6')-Ib-cr*, esso codifica per una variante dell'enzima *aminoglycoside acetyl-transferase* in grado di inattivare sia molecole appartenenti alla classe dei fluorochinoloni (ciprofloxacina e norfloxacina) che degli aminoglicosidi (Vetting *et al.*, 2008).

Di recente, è stato scoperto un terzo meccanismo in grado di conferire una ridotta sensibilità ai chinoloni e riguarda la presenza, soprattutto a

livello plasmidico, dei geni *qepA* e *oqxAB* (Hansen *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2005; Yamane *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2007; Cattoir *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010). Questi geni codificano per delle pompe di efflusso attive appartenenti rispettivamente alla *major facilitator* (MFS) *superfamily* e alla *resistance-nodulation division* (RND) *superfamily*.

La presenza del gene *qepA* a livello plasmidico è stata descritta per la prima volta nel 2007 in Giappone in un ceppo di *E. coli* isolato da un caso clinico umano di infezione urinaria (Yamane *et al.*, 2007). Il primo rilievo della presenza di *oqxAB* risale invece al 2004 in ceppi di *E. coli* isolati da suini resistenti all'olaquinox in Svezia e Danimarca (Hansen *et al.*, 2004). Queste proteine sono responsabili di una ridotta sensibilità ai fluorochinoloni idrofilici quali ciprofloxacina, enrofloxacin e norfloxacina in quanto impediscono l'accumulo di queste molecole all'interno della cellula batterica. E' infatti stato dimostrato che i batteri che esprimono queste pompe di efflusso presentano concentrazioni minimi inibenti (MIC) di queste molecole dalle 32 alle 64 volte superiori rispetto a coloro che ne sono privi (Perichon *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2007; Yamane *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009). Tuttavia, oltre a conferire resistenza ai fluorochinoloni, queste pompe di efflusso sono in grado di promuovere l'estrusione dalla cellula di numerosi altri composti non necessariamente correlati tra loro, concorrendo così alla diffusione di fenotipi di multifarmaco-resistenza nei ceppi in cui sono espresse. In particolare, *qepA* è responsabile di una ridotta sensibilità all'eritromicina e all'etidio bromuro mentre *oqxAB* alle tetracicline, al cloramfenicolo, al trimethoprim, all'olaquinox e ad alcuni disinfettanti quali la clorexidina (Hansen *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010). Inoltre *qepA* è stato riscontrato in un elemento trasponibile veicolante a sua volta un gene che codifica per l'enzima *aminoglycoside ribosome methyltransferase* responsabile della resistenza agli aminoglicosidi. E' quindi possibile che i batteri positivi per *qepA* siano seleziona-

ti dalla pressione esercitata dagli aminoglicosidi e viceversa (Yamane *et al.*, 2007).

In conclusione, i meccanismi alla base dello sviluppo della resistenza ai fluorochinoloni sono particolarmente complessi in quanto batteri con fenotipi di resistenza (o di multifarmaco-resistenza) a queste molecole possono essere selezionati dall'esposizione ad una vasta gamma di molecole chimicamente non correlate tra loro, conseguenza di eventi di co- e cross-selezione (Dalhoff, 2012).

Inoltre, a destare particolare preoccupazione è soprattutto la sempre più frequente associazione, nelle *Enterobacteriaceae*, tra la presenza di ESBL e i geni di resistenza a fluorochinoloni ed aminoglicosidi (*qnr* e *aac(6')-Ib-cr*) (Corkill *et al.*, 2005; Lavilla *et al.*, 2008; Strahilevitz *et al.*, 2009; Dalhoff, 2012). La localizzazione nello stesso plasmide dei determinanti di resistenza a molecole di prima scelta per il trattamento delle infezioni rappresenta infatti una grave minaccia per la salute pubblica. La diffusione di queste strutture nella popolazione batterica può compromettere l'efficacia dei trattamenti farmacologici sia in medicina umana che nella pratica zootecnica ed aumentare così la morbilità e la mortalità legate alle patologie di origine batterica.

Studio A

***Profili fenotipici di antibiotico-resistenza e
ricerca di integroni, plasmidi e geni PMQR
in ceppi di E. coli isolati da lagomorfi com-
merciali e selvatici***

1A. Introduzione e scopo dello studio

L'allevamento intensivo del coniglio da carne è diffuso in diversi Paesi di tutto il mondo. Secondo la Divisione Statistica dell'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (*Statistic Division of Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO-STAT) l'Italia rappresenta, dopo la Cina, il maggior produttore a livello mondiale. Si stima che nel mondo nel 2010 siano state prodotte 1 milione e 676 mila tonnellate di carne di coniglio. La Cina ha prodotto circa 669.000 tonnellate di carne mentre l'Italia, *leader* in Europa, 255.400 tonnellate. Nel nostro Paese infatti, l'allevamento del coniglio industriale occupa il quarto settore zootecnico per importanza economica dopo quello suino, avicolo e bovino, con un *trend* in crescita negli ultimi anni (FAO-STAT, 2012).

Si stima che in Italia vi siano circa 2500 allevamenti, la maggior parte dei quali si concentrano soprattutto nelle Regioni del Nord in particolare Lombardia, Piemonte e Veneto (Xiccato and Trocino, 2007).

Come già accennato, nell'allevamento del coniglio da carne la mortalità legata ad enteropatie di origine batterica è particolarmente elevata e per questo è diffuso l'utilizzo di molecole antimicrobiche quali sulfamidici, aminoglicosidi, macrolidi, polimixine, chinoloni e tetracicline a scopo profilattico oltre che terapeutico (EFSA, 2005; Abecia *et al.*, 2007). La progressiva perdita di efficacia dei trattamenti farmacologici rappresenta quindi una minaccia sia per le gravi perdite economiche legate ad un aumento della mortalità e morbidità degli animali in allevamento, ma soprattutto per la possibile trasmissione di batteri MDR e di determinanti genici di antibiotico-resistenza dagli animali all'uomo per contatto diretto, a seguito di una contaminazione ambientale oppure attraverso la catena alimentare (per esempio, a seguito del consumo di carni - o loro derivati - contaminati).

Il monitoraggio del fenomeno dell'antibiotico-resistenza in batteri isolati da animali a vita libera mai sottoposti a trattamenti farmacologici (coni-

gli selvatici e lepri) è invece particolarmente interessante in quanto può fornire indicazioni sulla sua diffusione nell'ambiente indipendentemente dalla pressione selettiva esercitata dai farmaci.

L'obiettivo dello studio è stata quindi la determinazione dei profili fenotipici e genotipici di antibiotico-resistenza dei ceppi di *E. coli* commensali e patogeni isolati sia da lagomorfi domestici che selvatici, con particolare riguardo alla ricerca delle strutture genetiche maggiormente coinvolte nella trasmissione orizzontale di determinanti genetici di antibiotico-resistenza tra batteri.

Lo studio è stato quindi rivolto alla ricerca e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e 2 e alla verifica della loro localizzazione a livello di elementi mobili di DNA, quali i plasmidi coniugativi. I ceppi batterici che hanno evidenziato particolari profili di antibiotico-resistenza sono stati genotipizzati mediante *Multilocus Sequence Typing* MLST e, una loro selezione, anche per quanto riguarda le principali classi di plasmidi più diffuse nelle *Enterobacteriaceae*.

Data l'importanza della sempre più diffusa resistenza nei confronti dei fluorochinoloni, molecole d'elezione nel trattamento delle infezioni batteriche in medicina veterinaria e soprattutto in umana, lo studio è proseguito con la ricerca dei geni *Plasmid Mediated Quinolone Resistance* (PMQR), in grado di conferire soprattutto una ridotta sensibilità a questa classe di antimicrobici nei batteri che li esprimono.

2A. Materiali e Metodi

2A.1 Campioni oggetto d'indagine

I ceppi di *E. coli* oggetto di questo studio sono stati reperiti grazie alla collaborazione con la Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare del Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Milano.

I campioni presi in esame comprendevano:

- i. ceppi di *E. coli* enteropatogeni (EPEC), isolati dal pacchetto intestinale di conigli commerciali (*Oryctolagus cuniculus*) provenienti da allevamenti del Nord-Italia (Lombardia, Piemonte e Veneto) e deceduti naturalmente per patologia enterica riconducibile a colibacillosi. La patogenicità di questi ceppi era stata confermata molecularmente mediante la ricerca di geni di virulenza (intimina e fimbrie);
- ii. ceppi di *E. coli* commensali, isolati dal contenuto intestinale di conigli selvatici (*Oryctolagus cuniculus*) esaminati nell'ambito di un'indagine condotta tra il 2006 e il 2008 riguardante lo studio dei lagomorfi selvatici nel Parco Regionale del fiume Serio (Bergamo);
- iii. ceppi di *E. coli* commensali isolati dal pacchetto intestinale di lepri selvatiche (*Lepus europeus europeus*) apparentemente sane, abbattute nelle stagioni venatorie 2006-2009 in Lombardia oppure provenienti dall'Ungheria e Sud-America nei piani di ripopolamento. Questi campioni sono stati reperiti grazie ad una collaborazione con Associazioni venatorie e ad alcuni Ambiti Territoriali di Caccia (ATC) della provincia di Sondrio.

L'indagine è stata condotta su un totale di 172 ceppi di *E. coli*, di cui 80 isolati da conigli commerciali, 33 da conigli selvatici e 59 da lepri. I ceppi batterici sono stati inviati al Laboratorio di Microbiologia e Malattie Infettive del Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione dell'Università degli Studi di Padova, dove sono state eseguite le successive analisi volte alla caratterizzazione dei profili fenotipici e genotipici

di antibiotico-resistenza mediante metodiche di microbiologia classica e biomolecolari.

2A.2 Determinazione dei profili fenotipici di antibiotico-resistenza

2A.2.1 Valutazione della sensibilità agli antimicrobici

I ceppi batterici sono stati rivitalizzati mediante semina su piastra di *Nutrient Agar* (OXOID, Basingstoke, UK) ed incubazione a 37°C per 18-24 ore. La valutazione della loro sensibilità alle molecole antimicrobiche è stata eseguita utilizzando il metodo di diffusione su piastra di Kirby-Bauer (1966), secondo la procedura raccomandata dal *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Sono state testate 16 molecole antimicrobiche appartenenti a 5 classi diverse:

i) Aminoglicosidi

- Aminosidina (AM) 60 µg (Ceva Pzifer Animal Health)
- Apramicina (APR) 15 µg (Elanco Lilly Animal Health)
- Gentamicina (CN) 10 µg (OXOID)
- Neomicina (N) 30 µg (OXOID)
- Streptomicina (STR) 10 µg (OXOID)

ii) Chinoloni

- Acido Nalidixico (NA) 30 µg (OXOID)
- Ciprofloxacina (CIP) 5 µg (OXOID)
- Enrofloxacin (ENR) 5 µg (Bayer)
- Flumechina (UB) 30 µg (OXOID)
- Norfloxacina (NOR) 30 µg (OXOID)

iii) Tetracicline

- Doxiciclina (DO) 30 µg (OXOID)
- Ossitetraciclina (OT) 30 µg (OXOID)
- Tetraciclina (TET) 30 µg (OXOID)

iv) Sulfamidici potenziati (Diaminopirimidine)

- Trisulfamidico (S3) 300 µg (OXOID)
- Sulfametossazolo + Trimethoprim (SXT) 25 µg (OXOID)

v) Fenicoli

- Cloramfenicolo (CAF) 30 µg (OXOID).

L'inoculo di ciascun ceppo è stato preparato sospendendo della patina batterica fresca in una provetta contenente 4 ml di soluzione salina sterile (0.9% w/v di NaCl) in modo tale da ottenere una sospensione batterica di torbidità paragonabile a quella dello *standard* 0.5 McFarland. Raggiunta la torbidità desiderata, si è proceduto con la semina su piastra di *Mueller-Hinton Agar* (OXOID) dove sono stati posizionati i dischetti impregnati di antimicrobico con l'ausilio di appositi *dispenser*. Le piastre sono state incubate in aerobiosi a 37°C per 24 ore, trascorse le quali sono stati misurati i diametri degli aloni di inibizione (in millimetri, mm). I risultati sono stati interpretati secondo i criteri stabiliti per le *Enterobacteriaceae* dal CLSI (CLSI, 2002; CLSI, 2006; CLSI, 2007) e dalla *Société Française de Microbiologie* (SFM, 2011), ad eccezione delle molecole AM, APR e ENO la cui valutazione è stata eseguita secondo le indicazioni fornite dalla Ditta produttrice. In questo modo è stato possibile classificare i ceppi come sensibili (S), intermedi (I) o resistenti (R) per ciascuna molecola antimicrobica testata.

La qualità è stata verificata utilizzando *E. coli* ATCC 25922 come controllo.

2A.3 Ricerca e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e di classe 2

2A.3.1 Estrazione del DNA batterico

I campioni sono stati sottoposti ad estrazione del DNA batterico utilizzando il kit commerciale *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics Corporation, Marnes La Coquette, France), seguendo il protocollo indicato dalla Ditta produttrice e la quantificazione del DNA estratto è stata eseguita mediante lettura spettrofotometrica con *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (ThermoFisher Scientific, USA).

2A.3.2 Ricerca di integroni di classe 1 e classe 2 mediante *real-time PCR*

Tutti i campioni sono stati sottoposti a una prima fase di *screening* mediante *real-time PCR* utilizzando come *primer* le sequenze descritte da Ekkabyotin *et al.* (2008) e due sonde oligonucleotidiche, di tipo *TaqMan* e *Molecular Beacon*, disegnate invece in questo studio. Questi saggi sono stati sviluppati con l'obiettivo di aumentare la specificità della metodica rispetto alle *real-time PCR* in SYBR *green* descritte da Ekkabyotin *et al.* (2008). Sono state quindi disegnate due sonde complementari ciascuna ad una porzione conservata del gene codificante rispettivamente l'integrasi di classe 1 e 2. Il disegno delle sonde e la valutazione della loro compatibilità con i *primer* presenti in letteratura sono stati eseguiti con il software *Beacon Designer v7.5* (Premier Biosoft, Palo Alto, CA, USA) mentre la loro specificità è stata verificata confrontando la loro sequenza nucleotidica con quelle presenti nel *database* del *National Centre for Biotechnology Information, GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) mediante il software BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

La messa a punto della metodica e la valutazione della sua specificità e sensibilità è stata condotta e verificata mediante l'esecuzione dei saggi di *real-time PCR* su una serie di ceppi di *E. coli* positivi e negativi agli integroni di entrambe le classi (gentilmente forniti dal Dr. G. Grilli, Università degli Studi di Milano e dal Dr. M. Sunde, Norwegian Veterinary Institute, Oslo, Norvegia).

Le sequenze dei *primer* e delle sonde oligonucleotidiche sono elencate nella tabella A.1.

Tabella A.1 *Primer* e sonde oligonucleotidici utilizzati per il rilievo della presenza degli integroni di classe 1 e di classe 2.

Primer/sonda	Gene target	Sequenza (5'-3')
Int1L-F	<i>intI1</i>	CAG GAG ATC GGA AGA CCT
Int1L-R		TTG CAA ACC CTC ACT GAT
TaqMan_1		5'-FAM-TGC CCG TTC CAT ACA GAA GC-3'-BFQ
IntI2-R	<i>intI2</i>	GGC AGA CAG TTG CAA GAC AA
IntI2-R		AAG CGA TTT TCT GCG TGT TT
MB_2		5'-FAM-CGC GAT CCA GCC TGA CCT CTT CAC TGC GAT CGC G-3'-IBFQ

Le prove sono state eseguite con lo strumento LightCycler ® 480 *Real-Time PCR System* (Roche Diagnostics corporation). Per quanto riguarda *intI1*, per ciascun campione è stata preparata una soluzione contenente 1X *Kapa probe fast qPCR MasterMix* (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA), 0,3 µM di ciascun *primer*, 0,2 µM di sonda *TaqMan* e 100 ng di DNA batterico in un volume di reazione finale di 10 µl. Le condizioni di amplificazione prevedevano 35 ripetizioni del ciclo caratterizzato da una fase di denaturazione a 95°C per 3 secondi e da una di *annealing* ed estensione a 60° C per 30 secondi, precedute da un ciclo di attivazione dell'enzima a 95 °C x 3 minuti.

Per quanto riguarda *intI2*, per ciascun campione è stata preparata una soluzione contenente 1X *Kapa probe fast qPCR MasterMix* (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA), 0,3 µM di ciascun *primer*, 0,5 µM di sonda *Molecular Beacon* e 100 ng di DNA batterico in un volume di reazione finale di 10 µl. Le condizioni di amplificazione prevedevano 35 ripetizioni del ciclo caratterizzato da una fase di denaturazione a 95°C per 3 secondi, una di *annealing* a 50° C per 30 secondi e da una si estensione a 72°C per 1 minuto, precedute da un ciclo di attivazione dell'enzima a 95 °C x 3 minuti. Ad ogni reazione sono stati aggiunti un controllo positivo e un bianco di reazione e le analisi dei risultati sono state condotte con il software *LightCycler 480 v1.5*.

2A.3.3 Amplificazione della regione variabile degli integroni

I campioni risultati positivi agli integroni di classe 1 e/o 2 sono stati sottoposti ad amplificazione della regione variabile in essi contenuta utilizzando i *primer* decritti rispettivamente da Lévesque *et al.* (1995) e White (2001).

Le sequenze oligonucleotidiche dei *primer* sono riportate nella tabella A.2.

Tabella A.2 *Primer* oligonucleotidici utilizzati per l'amplificazione della regione variabile degli integroni di classe 1 e di classe 2.

Primer/sonda	Gene target	Sequenza (5'-3')
CS3	CS_int1	GGC ATC CAA GCA GCA AG
CS5		AAG CAG ACT TGA CCT GA
HepF	attI2-Tn7	CGG GAT CCC GGA CGG CAT GCA CGA TTT GTA
HepR		GAT GCC ATC GCA AGT ACG AG

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite nel termociclatore 2720 *Thermal Cycler* (Life Technologies Corporation) in un volume di reazione finale di 50 µl. L'amplificazione è stata eseguita utilizzando *High Fidelity Taq DNA polymerase* (Life Technologies Corporation, California, USA). La miscela di reazione era composta da 1X *Buffer*, 0.2 mM di ciascun *nucleotide trifosfato*, 2 mM di MgSO₄, 0,5 µM di ciascun *primer*, 1 U di *HF Platinum® Taq DNA polymerase* e 100 ng di DNA estratto.

Il profilo di amplificazione prevedeva 40 ripetizioni del ciclo caratterizzato da una fase di denaturazione a 94°C per 30 secondi, una fase di *annealing* a 55°C per 30 secondi ed una di estensione a 68°C per 5 minuti, preceduto da una fase di attivazione dell'enzima a 94°C per 2 minuti e seguito da una post-estensione a 72°C per 5 min.

Ad ogni reazione sono stati aggiunti un controllo positivo e un bianco di reazione.

I prodotti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1% (w/v) in *Buffer* TBE 1X (Tris 90 mM, acido borico 90 mM, E-

DTA 2 mM, pH 8) con l'aggiunta di 0.1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ (v/v) di *SybrSafeTM TM DNA Gel Stain* (Life Technologies Corporation). Le bande venivano visualizzate con il transilluminatore *Gel DocTM XR* (BioRad, Marnes la Coquette, France) e, per verificare le dimensioni degli amplificati, ad ogni corsa elettroforetica si aggiungeva *DNA Ladder 100 bp* (Genespin, Milano, Italia) come marcatore di peso molecolare.

2A.3.4 Sequenziamento nucleotidico delle regioni variabili

Prima di procedere al sequenziamento nucleotidico, i prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando il kit commerciale *High Pure PCR Cleanup Micro Kit* (Roche Diagnostic Corporation) secondo le specifiche fornite dalla Ditta produttrice e sottoposti a corsa elettroforetica come descritto nel paragrafo precedente. Gli amplificati purificati sono stati sequenziati in entrambe le direzioni utilizzando il kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1* (Life Technologies Corporation) secondo il protocollo descritto dalla Ditta produttrice e gli stessi *primer* usati per l'amplificazione. La miscela di reazione prevedeva un volume finale di 10 μl che si componeva di 1.6 pmoli di *primer* e 1-2 ng di amplificato ogni 100 bp. La reazione di sequenza prevedeva 25 ripetizioni del ciclo 95°C per 10 secondi, 50°C per 5 secondi e 60°C per 4 minuti. Seguiva una fase di purificazione del prodotto mediante precipitazione con una soluzione di 2-propanolo per eliminare i *Dye Terminators* non incorporati. A ciascun campione quindi si aggiungevano 50 μl di 2-propanolo al 75% (v/v) e si incubava per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo 45 minuti di centrifugazione a 3.000 rpm, il surnatante veniva eliminato per inversione e i *pellet* così ottenuti venivano ri-sospesi ciascuno in 15 μl di acqua bidistillata sterile e sottoposti a elettroforesi capillare con lo strumento *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Life Technologies Corporation) del Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova.

2A.3.5 Analisi delle sequenze

Gli elettroferogrammi delle sequenze ottenute, sia in *forward* sia in *reverse*, sono stati letti separatamente e poi assemblati al fine di ottenere una sequenza consenso. L'analisi e l'assemblaggio dei cromatogrammi sono stati eseguiti utilizzando il software *ChromasPro*, v1.42 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia).

E' stata poi eseguita una ricerca per similarità delle sequenze consenso con i dati disponibili in *Genbank* utilizzando il server BLAST. In questo modo è stato possibile definire le cassette geniche contenute nella regione variabile di ciascun integrone.

2A.4 Tipizzazione batterica mediante Multilocus Sequence Typing (MLST)

La caratterizzazione molecolare dei ceppi che veicolano gli integroni e/o i geni PMQR è stata eseguita mediante MLST che consiste nell'amplificazione e successivo sequenziamento ed analisi di porzioni di 7 geni *housekeeping* di *E. coli*.

2.A.4.1 Amplificazione e sequenziamento dei 7 loci genici

L'amplificazione e il sequenziamento nucleotidico dei 7 geni *housekeeping* (*aspC*, *clpX*, *fadD*, *icdA*, *lysP*, *mdh*, and *uidA*) sono stati eseguiti secondo lo schema proposto nel *Multilocus Sequence typing database for pathogenic E. coli*, *EcMLST*, sviluppato dal *Microbial Evolution Laboratory* dell'Università dello Stato del Michigan (<http://www.shigatox.net/ecmlst/cgi-bin/index>). Le sequenze oligonucleotidiche dei *primer* e le dimensioni di ciascun amplicone sono riportate nella tabella A.3.

Tabella A.3 *Primer oligonucleotidici utilizzati per l'amplificazione e il sequenziamento nucleotidico dei 7 geni housekeeping per la genotipizzazione di E. coli.*

Primer	Gene target	Sequenza (5'-3')	Amplicone (pb)
aspC-F4	<i>aspC</i>	GTT TCG TGC CGA TGA ACG TC	594
AspC-R7		AAA CCC TGG TAA GCG AAG TC	
clpX-F6	<i>clpX</i>	CTG GCG GTC GCG GTA TAC AA	672
clpX-R1		GAC AAC CGG CAG ACG ACC AA	
fadD-F6	<i>fadD</i>	GCT GCC GCT GTA TCA CAT TT	580
fadD-R3		GCG CAG GAA TCC TTC TTC AT	
icd-F2	<i>icdA</i>	CTG CGC CAG GAA CTG GAT CT	669
icd-R2		ACC GTG GGT GGC TTC AAA CA	
lysP-F1	<i>lysP</i>	CTT ACG CCG TGA ATT AAA GG	628
lysP-R8		GGT TCC CTG GAA AGA GAA GC	
mdh-F3	<i>Mdh</i>	GTC GAT CTG AGC CAT ATC CCT AC	650
mdh-R4		TAC TGA CCG TCG CCT TCA AC	
uid-277F	<i>uidA</i>	CAT TAC GGC AAA GTG TGG GTC AAT	658
uid-934R		CCA TCA GCA CGT TAT CGA ATC CTT	

Le reazioni di amplificazione sono state condotte nel termociclatore 2720 *Thermal Cycler* (Life Technologies Corporation) in un volume di reazione finale di 50 µl. La miscela di reazione era composta da 1X *Buffer*, 0.2 mM di ciascun *nucleotide trifosfato*, 2 mM di MgSO₄, 0,5 µM di ciascun *primer*, 1 U di *HF Platinum® Taq DNA polymerase* (Life Technologies Corporation) e 100 ng di DNA estratto.

Il profilo di amplificazione prevedeva 40 ripetizioni del ciclo caratterizzato da una fase di denaturazione a 94°C per 30 secondi, una fase di *annealing* a 58°C per 30 secondi ed una di estensione a 68°C per 5 minuti, preceduto da una fase di attivazione dell'enzima a 94°C per 2 minuti e seguito da una post-estensione a 72°C per 5 minuti.

Ad ogni reazione sono stati aggiunti un controllo positivo e un bianco di reazione.

I prodotti di PCR sono stati separati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 2% (w/v) in *Buffer* TBE 1X con l'aggiunta di 0.1 µl/ml (v/v) di *SybrSafe™ TM DNA Gel Stain* (Life Technologies Corporation). Le bande venivano visualizzate con il transilluminatore *Gel Doc™ XR* (Bio-Rad) e, per verificare le dimensioni degli amplificati, ad ogni corsa elettroforetica si aggiungeva *pUC Mix Marker 8* (ThermoFisher Scientific) come marcatore di peso molecolare.

I prodotti di PCR così ottenuti sono stati purificati utilizzando il kit commerciale *High Pure PCR Clean-up Micro Kit* (Roche Diagnostic Corporation) secondo il protocollo descritto dalla Ditta produttrice e sequenziati in entrambe le direzioni come descritto nel paragrafo 2A.3.4.

2.A.4.2 Analisi dei dati

Le sequenze senso e antisenso di ciascun *locus* genico sono state analizzate ed assemblate con il *software ChromasPro v1.42* (Technelysium Pty Ltd.), quindi confrontate con quelle disponibili nel *database* di riferimento *EcMLST* al fine di poter definire il profilo allelico di ciascun ceppo (o *Sequence Type*, ST) e il relativo complesso clonale di appartenenza, se definito. I nuovi alleli o profili allelici sono stati sottomessi nel sito affinché fosse assegnato loro un numero ed inseriti nel *database*.

Le sequenze sono state inoltre sottoposte ad analisi filogenetica esplorativa. L'allineamento è stato ottenuto sfruttando l'algoritmo MAFFT con il *software* Guidance. Il *confidence score* è stato ottenuto e valutato su 100 replicati di *bootstrap* (Penn *et al.*, 2010). Le relazioni filogenetiche sono state ricostruite sfruttando un algoritmo di *Maximum Likelihood* con il *software* RAxML 7.3.0 (Stamatakis, 2006).

2A.5 Ricerca dei geni Plasmid Mediated Quinolone Resistance (PMQR)

2.A.5.1 Ricerca dei geni PMQR mediante PCR end-point

La ricerca dei geni PMQR *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA* e *oqxA* e *oqxB* è stata eseguita utilizzando i *primer* descritti da Robicsek *et al.* (2006), Yamane *et al.* (2008), Wang *et al.* (2009), Cavaco *et al.* (2009) e Kim *et al.* (2009) ed elencati nella tabella A.4.

Le reazioni di amplificazione sono state condotte nel termociclatore 2720 *Thermal Cycler* (Life Technologies Corporation) in un volume di reazione finale di 25 µl. La miscela di reazione era composta da 1X *Kapa2G Fast HotStart ReadyMix* (Kapa Biosystems), 0,5 µM di ciascun *primer* e 50 ng di DNA estratto.

Il profilo di amplificazione prevedeva 35 ripetizioni del ciclo caratterizzato da una fase di denaturazione a 95°C per 15 secondi, una fase di *annealing* a 58°C (per *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*), a 60°C (per *qepA*, *oqxA* e *oqxB*) per 15 secondi ed una di estensione a 72°C per 15 secondi, preceduto da una fase di attivazione dell'enzima a 95°C per 3 minuti e seguito da una post-estensione a 72°C per 1 minuto. Ad ogni reazione sono stati aggiunti un controllo positivo (gentilmente fornito dalla Dr.ssa A. Carattoli, Istituto Superiore di Sanità, Roma) e un bianco di reazione.

I prodotti di PCR sono stati separati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 2% (w/v) in *Buffer TBE* 1X con l'aggiunta di 0.1 µl/ml (v/v) di *SybrSafe™ TM DNA Gel Stain* (Life Technologies Corporation). Le bande venivano visualizzate con il transilluminatore *Gel Doc™ XR* (Bio-Rad) e, per verificare le dimensioni degli amplificati, ad ogni corsa elettroforetica si aggiungeva *pUC Mix Marker 8* (ThermoFisher Scientific) come marcatore di peso molecolare.

Tabella A.4 *Primer oligonucleotidici utilizzati per l'amplificazione e il sequenziamento nucleotidico dei geni PMQR.*

Primer	Sequenza (5'-3')	Amplicone (pb)	Fonte bibliografica
qnrA-F	ATTTCTCACGCCAGGATTG	516	Robicsek <i>et al.</i> , 2006
qnrA-R	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA		
qnrB-F	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469	Robicsek <i>et al.</i> , 2006
qnrB-R	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
qnrC-F	GGGTTGTACATTTATTGAATCG	447	Wang <i>et al.</i> , 2009
qnrC-R	TCCACTTTACGAGGTTCT		
qnrD-F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	593	Cavaco <i>et al.</i> , 2009
qnrD-R	AACAAGCTGAAGCGCCTG		
qnrS-F	ACGACATTCGTCAACTGCAA	417	Robicsek <i>et al.</i> , 2006
qnrS-R	TAAATTGGCACCCTGTAGGC		
oqxA-F	CTCGGCGCGATGATGCT	392	Kim <i>et al.</i> , 2009
oqxA-R	CCACTCTTCACGGGAGACGA		
oqxB-F	TTCTCCCCCGGCGGGAAGTAC	512	Kim <i>et al.</i> , 2009
oqxB-R	CTCGGCCATTTTGGCGCGTA		
qepA-F	GCA GGT CCA GCAGCG GGT AG	199	Yamane <i>et al.</i> , 2008
qepA-R	CTT CCT GCC CGAGTA TCG TG		

I prodotti di PCR così ottenuti sono stati purificati utilizzando il kit commerciale *High Pure PCR Clean-up Micro Kit* (Roche Diagnostic Corporation) secondo il protocollo descritto dalla Ditta produttrice e sequenziati in entrambe le direzioni come descritto nel paragrafo 2A.3.4. L'analisi delle sequenze è stata condotta come descritto nel paragrafo 2A.3.5 e allineate tra loro e confrontate mediante *ClustalW* del *Pole Bioinformatique Lyonnais, France* (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalwan.html), utilizzando i parametri di default del *software*.

2A.6 Tipizzazione plasmidica mediante PCR-Based Replicon Typing (PBRT)

Grazie ad una collaborazione con il Laboratorio di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immuno-mediate dell'Istituto Superiore di Sanità (Roma), è stata eseguita la tipizzazione plasmidica mediante PBRT di 30 ceppi rappresentativi (per resistotipo fenotipico e genotipico) della popolazione batterica in esame.

2.A.6.1 Amplificazione e sequenziamento dei repliconi

Le reazioni di PCR sono state eseguite seguendo il protocollo descritto da Carattoli *et al.* (2005), Garcia-Fernandez *et al.* (2009) e Johnson *et al.* (2012) salvo lievi modifiche.

Sono state allestite 5 *multiplex* PCR e 7 *simplex* PCR per il rilievo dei repliconi FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-I γ , L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, FIIA, R, U, colE e X1 come descritto nella tabella A.5.

Le *multiplex* PCR sono state condotte nel termociclatore 2720 *Thermal Cycler* (Life Technologies Corporation) in un volume di reazione finale di 25 μ l. La miscela di reazione era composta da 1X *Kapa 2GFast Multiplex Mix* (Kapa Biosystems), 0,3 μ M di ciascun *primer* e 100 ng di DNA estratto.

Il profilo di amplificazione prevedeva 30 ripetizioni del ciclo caratterizzato da una fase di denaturazione a 95°C per 15 secondi, una fase di *annealing* a 60°C per 30 secondi ed una di estensione a 72°C per 15 secondi, preceduto da una fase di attivazione dell'enzima a 95°C per 3 minuti e seguito da una post-estensione a 72°C per 2 minuti.

Le *simplex* PCR prevedevano una miscela di reazione composta da 2X *Kapa2G Fast HotStart ReadyMix* (Kapa Biosystems), 0,5 μ M di ciascun *primer* e 50 ng di DNA estratto in un volume di reazione finale di 25 μ l.

Il profilo di amplificazione prevedeva 30 ripetizioni del ciclo caratterizzato da una fase di denaturazione a 95°C per 15 secondi, una fase di *annealing* a 60°C per 15 secondi ed una di estensione a 72°C per 15 se-

condi, preceduto da una fase di attivazione dell'enzima a 95°C per 3 minuti e seguito da una post-estensione a 72°C per 1 minuto. Unica eccezione per repF la cui temperatura di *annealing* era di 54°C.

Ad ogni reazione sono stati aggiunti un controllo positivo (gentilmente fornito dalla Dr.ssa A. Carattoli, Istituto Superiore di Sanità, Roma) e un bianco di reazione.

I prodotti di PCR sono stati separati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 3% (w/v) in *Buffer* TBE 1X con l'aggiunta di 0.1 µl/ml (v/v) di *SybrSafe™ TM DNA Gel Stain* (Life Technologies Corporation). Le bande venivano visualizzate con il transilluminatore *Gel Doc™ XR* (Bio-Rad) e, per verificare le dimensioni degli amplificati, ad ogni corsa elettroforetica si aggiungeva *pUC Mix Marker 8* (ThermoFisher Scientific) come marcatore di peso molecolare.

Le positività rilevate mediante *multiplex* PCR sono state confermate ripetendo le reazioni di amplificazione separatamente e ciascun amplificato è stato purificato, sequenziato ed analizzato come descritto nei paragrafi 2A.3.4 e 2A.3.5.

Tabella A.5 *Primer oligonucleotidici e schema di amplificazione utilizzati per la tipizzazione plasmidica mediante PBRT (continua).*

PCR	Primer	Sequenza (5'-3')	Gene target	Amplicone (pb)
Multiplex PCR 1	HI1-F	GGA GCG ATG GAT TAC TTC AGT AC	parA-parB	471
	HI1-R	TGC CGT TTC ACC TCG TGA GTA		
	HI2-F	TTT CTC CTG AGT CAC CTG TTA ACA C	Iterons	644
	HI2-R	GGC TCA CTA CCG TTG TCA TCC T		
	I1-F	CGA AAG CCG GAC GGC AGA A	RNAI	139
	I1-R	TCG TCG TTC CGC CAA GTT CGT		
Multiplex PCR 2	X-F	AAC CTTA GAG GCT ATT TAA GTT GCT GAT	Ori γ	376
	X-R	TGA GAG TCA ATT TTT ATC TC A TGT TTTAGC		
	L/M-F	GGA TGA AAA CTA TCA GCA TCT GAA G	repA,B,C	785
	L/M-R	CTG CAG GGG CGA TTC TTT AGG		
	N-F	GTC TAA CGA GCT TAC CGA AG	repA	559
	N-R	GTTT CAA CTC TGC CAA GTT C		
Multiplex PCR 3	FIA-F	CCA TGC TGG TTC TAG AGA AGG TG	Iterons	462
	FIA-R	GTA TAT CCT TAC TGG CTT CCG CAG		
	FIB-F	GGA GTT CTG ACA CAC GAT TTT CTG	repA	702
	FIB-R	CTC CCG TCG CTT CAG GGC ATT		
	W-F	CCT AAG AAC AAC AAA GCC CCC G	repA	242
	W-R	GGT GCG CGG CAT AGA ACC GT		
Multiplex PCR 4	Y-F	AAT TCA AAC AAC ACT GTG CAG CCT G	repA	765
	Y-R	GCG AGA ATG GAC GAT TAC AAA ACT TT		
	P-F	CTA TGG CCC TGC AAA CGC GCC AGA AA	Iterons	534
	P-R	TCA CGC GCC AGG GCG CAG CC		
	FIC-F	GTG AAC TGG CAG ATG AGG AAG G	repA2	262
	FIC-R	TTC TCC TCG TCG CCA AAC TAG AT		
Multiplex PCR 5	A/C-F	GAG AAC CAA AGA CAA AGA CCT GGA	repA	465
	A/C-R	ACG ACA AAC CTG AAT TGC CTC CTT		
	T-F	TTG GCCT GTT TGT GCC TAA ACC AT	repA	750
	T-R	CGT TGA TTA CAC TTA GCT TTG GAC		
	FII _s -F	CTG TCG TAA GCT GAT GGC	repA	270
	FII _s -R	CTC TGC CAC AAA CTT CAG C		
Simplex PCR 1	F _{repB} -F	TGA TCG TTT AAG GAA TTT TG	RNAI/repA	270
	F _{repB} -R	GAA GAT CAG TCA CAC CAT CC		

PCR	Primer	Sequenza (5'-3')	Gene target	Amplicone (pb)
Simplex PCR 2	K/B-F K-R	GCG GTC CGG AAA GCC AGA AAA C TCT TTC ACG AGC CCG CCA AA	RNAI	160
Simplex PCR 3	K/B-F B/O-R	GCG GTC CGG AAA GCC AGA AAA C TCT GCG TTC CGC CAA GTT CGA	RNAI	159
Simplex PCR 4	U-F U-R	TCA CGA CAC AAG CGC AAG GG TCA TGG TAC ATC TGG GCG C	repA	843
Simplex PCR 5	oricolE-F oricolE-R	GTT CGT GCA TAC AGT CCA GGC GAA ACC CGA CAG GAC	OriV	187
Simplex PCR 6	R-F R-R	TCG CTT CAT TCC TGC TTC AGC GTG TGC TGT GGT TAT GCC TCA	repB	251
Simplex PCR 7	X1-F X1-R	GCTTAGACTTTGTTTTATCGTT TAATGATCCTCAGCATGTGAT	taxC	461

2A.7 Verifica della localizzazione degli integroni a livello plasmidico

2.A.7.1 Estrazione del DNA plasmidico

Due ceppi di *E. coli* risultati dalle precedenti analisi positivi agli integroni di classe 1, sono stati sottoposti ad estrazione del DNA plasmidico utilizzando il kit *PureLink® HiPure Plasmid Midiprep Kit* (Life Technologies Corporation) secondo la procedura descritta dalla Ditta produttrice.

2.A.7.2 Trasformazione di cellule batteriche competenti

Le cellule batteriche *MAX Efficiency® DH5a™ Competent Cells* (Life Technologies Corporation), rese competenti chimicamente con una soluzione di cloruro di calcio (CaCl_2), sono state trasformate con il DNA plasmidico precedentemente estratto seguendo le specifiche descritte dal Produttore. Le cellule batteriche sono state piastrate su *Luria Bertani Agar* (BD Difco™) a cui era stato precedentemente aggiunto, come agente selettivo, l'antimicrobico streptomicina (la cui resistenza è veicolata dall'integrone) alla concentrazione di 30 µg/ml. Al termine dell'incubazione a 37°C per 18-24 ore, le colonie batteriche trasformanti sono state sottoposte ad estrazione del DNA mediante lisi per bollitura in 200 µl di acqua deionizzata sterile e conservate a temperatura di refrigerazione per le successive indagini.

2.A.7.3 ricerca degli integroni nelle cellule batteriche trasformanti e tipizzazione del contenuto plasmidico

La presenza degli integroni e dei plasmidi che sono stati acquisiti per trasformazione dalle cellule competenti è stata verificata ripetendo le analisi descritte nei paragrafi 2A.3.3 e 2A.6.1 sul DNA batterico estratto dalle cellule trasformanti.

3A. Risultati

3A.1 Valutazione della sensibilità alle molecole antimicrobiche

3A.1.1 Profili di antibiotico-resistenza

I 172 ceppi di *E. coli* oggetto di studio sono stati sottoposti alla valutazione della sensibilità a 16 molecole appartenenti a 5 classi di antimicrobici diverse.

Per quanto riguarda gli 80 ceppi di *E. coli* isolati da conigli commerciali, le resistenze più elevate sono state riscontrate nei confronti delle tetracicline. Infatti, il 98,7% dei ceppi è risultato resistente a tutte e tre le molecole testate appartenenti a questa classe (tetraciclina, doxiciclina e ossitetraciclina). Livelli di resistenza simili sono stati rilevati anche nei confronti di alcuni sulfamidici ed aminoglicosidi. In particolare, il 98,8% dei ceppi è risultato resistente al trisulfamidico, il 92,5% alla neomicina e l'86,3% alla streptomina (Tabella A.6).

Più della metà dei ceppi ha inoltre evidenziato resistenza anche nei confronti di altre molecole appartenenti alla classe degli aminoglicosidi quali la gentamicina (65%) e l'apramicina (57,5%), dei chinoloni quali l'acido nalidixico (75%) e la flumechina (53,7%) e al sulfamidico potenziato sulfametossazolo e trimethoprim (58,7%) (Tabella A.6).

Una percentuale di ceppi superiore al 30% ha inoltre mostrato resistenza nei confronti del cloramfenicolo (41,3%), dell'aminosidina (36,25%) e dell'enrofloxacin (31,3%) mentre le sensibilità più elevate sono emerse nei confronti dei fluorochinoloni di seconda generazione quali la norfloxacin (88,7%) e la ciprofloxacin (61,2%). Tuttavia è importante evidenziare che una percentuale non trascurabile di ceppi, compresa tra il 20% e il 50%, ha presentato una sensibilità intermedia nei confronti di diverse molecole, soprattutto dell'aminosidina (53,8%), ciprofloxacin (32,5%) e cloramfenicolo (35%) (Tabella A.6).

Per quanto riguarda invece gli *E. coli* isolati dai conigli selvatici, la totalità dei ceppi è risultato resistente al trisulfamidico (100%) e una percentuale superiore al 90% nei confronti delle tetracicline e ad alcuni aminoglicosidi, in particolare alla streptomicina (93,9%). Seppur con percentuali più contenute, un numero importante di ceppi ha mostrato resistenze nei confronti dell'aminoglicoside apramicina (81,8%), dei chinoloni quali l'acido nalidixico (78,8%), la flumechina (54,6%) e l'enrofloxacin (45,5%) e al sulfametossazolo potenziato con il trimethoprim (69,8%). Una percentuale non trascurabile di ceppi ha mostrato una sensibilità intermedia nei confronti degli aminoglicosidi ampicillina (51,5%) e neomicina (24,2%) e dei chinoloni enrofloxacin (33,3%) e flumechina (24,2%). Analogamente a quanto riscontrato nei ceppi isolati dai conigli d'allevamento, le sensibilità più elevate sono state riscontrate ai fluorochinoloni norfloxacin (63,6%) e ciprofloxacin (60,6%) (Tabella A.6).

Prendendo in considerazione invece i ceppi di *E. coli* isolati da lepri selvatiche, in generale sono state rilevate resistenze più contenute nei confronti di tutte le molecole antimicrobiche testate. Le percentuali di resistenza più elevate si riferiscono, come per i ceppi isolati dalle altre specie animali, alle tetracicline, ad alcuni aminoglicosidi e sulfamidici. Per quanto riguarda le tetracicline, il 52,6%, il 37,3% e il 32,2% dei ceppi ha presentato resistenza nei confronti rispettivamente della doxiciclina, ossitetraciclina e tetraciclina. In riferimento agli aminoglicosidi invece, il 39% dei ceppi è risultato resistente alla neomicina e il 28,8% alla streptomicina mentre, per quanto riguarda i sulfamidici, il 55,9% al trisulfamidico. Analogamente a quanto evidenziato nei ceppi isolati da conigli domestici e/o selvatici, una percentuale elevata di ceppi ha mostrato una sensibilità intermedia nei confronti della neomicina (59,3%) e ampicillina (49,1%) ma, diversamente dagli altri, anche nei confronti dell'ossitetraciclina (42,4%), tetraciclina (37,3%) e doxiciclina (23,7%) (Tabella A.6).

Tabella A.6 Percentuali di ceppi di *E.coli* risultati sensibili (S), intermedi (I) e resistenti (R) alle molecole antimicrobiche testate, isolati da conigli commerciali, conigli selvatici e lepri.

Molecole antimicrobiche		Conigli commerciali			Conigli selvatici			Lepri		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R
Aminoglicosidi	STR	0%	13,7%	86,3%	0%	6,1%	93,9%	20,3%	50,9%	28,8%
	N	0%	7,5%	92,5%	0%	24,2%	75,8%	1,7%	59,3%	39,0%
	CN	32,5%	2,5%	65%	27,3%	3,0%	69,7%	94,9%	0%	5,1%
	AM	10%	53,8%	36,2%	36,4%	51,5%	12,1%	38,9%	49,1%	12,0%
	APR	40%	2,5%	57,5%	15,2%	3,0%	81,8%	81,4%	1,6%	17,0%
Chinoloni	NA	22,5%	2,5%	75%	9,1%	12,1%	78,8%	79,7%	8,4%	11,9%
	UB	26,3%	20%	53,7%	21,2%	24,2%	54,6%	79,7%	10,2%	10,1%
	ENR	33,7%	35%	31,3%	21,2%	33,3%	45,5%	93,2%	6,8%	0%
	CIP	61,2%	32,5%	6,3%	60,6%	12,1%	27,3%	100%	0%	0%
	NOR	88,7%	1,3%	10%	63,6%	9,1%	27,3%	100%	0%	0%
Sulfamidici	SXT	37,5%	3,7%	58,8%	24,2%	6,0%	69,8%	83,0%	0%	17,0%
	S3	1,2%	0%	98,8%	0%	0%	100%	42,4%	1,7%	55,9%
Tetracicline	OT	0%	1,3%	98,7%	0%	6,1%	93,9%	20,3%	42,4%	37,3%
	TET	0%	1,3%	98,7%	3,0%	3,1%	93,9%	30,5%	37,3%	32,2%
	DO	0%	1,3%	98,7%	3,0%	3,1%	93,9%	23,7%	23,7%	52,6%
Fenicoli	CAF	23,7%	35%	41,3%	30,3%	42,4%	27,3%	49,1%	44,1%	6,8%

Legenda: STR=streptomicina; N=neomicina; CN=gentamicina; AM=aminosidina; APR=apramicina; NA=acido nalidixico; UB=flumechina; ENR=enrofloxacina; CIP=ciprofloxacina; NOR=norfloxacina; SXT=sulfametossazolo + trimethoprim; S3=trisulfamidico; OT=ossitetraciclina; TET=tetraciclina; DO=doxiciclina; CAF=cloramfenicolo.

3A.1.2 Profili di multifarmaco-resistenza

La maggior parte dei ceppi di *E.coli* isolati sia da lagomorfi domestici che selvatici ha mostrato profili di multifarmaco-resistenza, intesa come la resistenza a 3 o più classi di antimicrobici. I ceppi sono stati considerati resistenti ad una classe quando presentavano resistenza ad almeno una delle molecole antimicrobiche appartenenti alla stessa.

Considerandoli separatamente in base alla specie animale da cui sono stati isolati, la maggior parte dei ceppi isolati da conigli commerciali e selvatici hanno mostrato resistenza a 4 o 5 classi di antimicrobici mentre gli isolati da lepri da 3 a 5 classi (Tabella A.7).

Tabella A.7 Profili di multifarmaco-resistenza (MDR) dei ceppi di *E. coli* isolati da conigli commerciali, conigli selvatici e lepri.

Specie Animale	Numero di classi Antimicrobiche	Profilo di MDR	Numero di ceppi di <i>E. coli</i>
Conigli Commerciali	5	ChAmTeSulFen	21
	4	ChAmTeSul	42
	4	AmTeSulFen	12
Conigli Selvatici	5	ChAmTeSulFen	8
	4	ChAmTeSul	19
	4	AmTeSulFen	4
Lepri	5	ChAmTeSulFen	1
	4	ChAmTeSul	8
	4	AmTeSulFen	3
	3	AmTeSul	17
	3	ChAmTe	1

Legenda: Ch=chinoloni; Am=aminoglicosidi; Tet=tetracicline; Sul=sulfamidici; Fen=fenicoli.

In particolare, hanno mostrato profili di multifarmaco-resistenza 75/80 ceppi (93,75%) isolati da conigli commerciali, 31/33 (93,93%) isolati da conigli selvatici e 30/59 (50,84%) da lepri.

I *pattern* di resistenza riscontrati con maggior frequenza nei ceppi isolati dagli animali domestici sono stati le combinazioni delle classi ChAmTeSul (42/75 ceppi; 56%), ChAmTeSulFen (21/75; 28%) e AmTeSulFen

(12/75; 16%). Analogamente, anche gli *E. coli* isolati dai conigli selvatici hanno mostrato gli stessi *pattern* di resistenza e in una percentuale di ceppi del tutto simile a quelli isolati da conigli commerciali. In particolare, 19/31 ceppi (61%) ha presentato la combinazione ChAmTeSul, 8/31 (26%) ChAmTeSulFen e 4/31 (13%) AmTeSulFen.

Diversamente, i ceppi isolati da lepri hanno presentato più combinazioni di classi antimicrobiche a cui hanno mostrato resistenza. In particolare, 17/30 ceppi (57%) il *pattern* AmTeSul, 8/30 (27%) ChAmTeSul, 3/30 (10%) AmTeSulFen e 1/30 (3%) ChAmTe. Un solo ceppo è risultato invece resistente alla totalità delle classi testate, mostrando il profilo ChAmTeSulFen.

3A.2 Presenza e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e di classe 2

3A.2.1 *E. coli* isolati da conigli commerciali

Su un totale di 80 *E. coli* testati, 52 ceppi sono risultati positivi agli integroni di classe 1 (65%) mentre nessuno è risultato positivo agli integroni di classe 2. La maggior parte di questi ceppi è stata isolata da conigli da carne provenienti da allevamenti di Lombardia, Piemonte e Veneto nel biennio 2006-2007 mentre nessuno degli isolati nell'anno 2008 è risultato portatore di queste strutture. In particolare, 32/52 ceppi (61%) provenivano da allevamenti lombardi e, di questi, 19/32 (59%) campionati nel 2006 e 13/32 (41%) nel 2007. Dei restanti 20 ceppi, 10 (50%) provenivano da animali di allevamenti piemontesi e 10 (50%) da allevamenti veneti campionati sempre nello stesso periodo.

Per quanto riguarda la caratterizzazione di queste strutture, l'amplificazione ed il successivo sequenziamento della regione variabile hanno evidenziato la presenza di frammenti di dimensioni comprese tra 1000 pb e 1500 pb. Oltre alla presenza del gene *sul1*, la cassetta genica più frequente è stata *aadA1*, riscontrata in 26/52 ceppi (50%), codificante per l'enzima *aminoglycoside 3'-adenyltransferase* responsabile della resistenza ad alcuni aminoglicosidi quali la streptomicina e la spectinomycin. Tuttavia sono state riscontrate anche le combinazioni dei geni *aadA* e *dfrA*, talvolta incompleti, nelle varianti *dfrA1-aadA1* e *dfrA17-aadA5* in 21/52 ceppi (40%), *orfIN682-dfrA5-orfD* in 4/52 ceppi (8%) e *orfIN682-dfrA5* in un solo ceppo. Il gene *dfrA* codifica per l'enzima *dihydrofolate-reductase* responsabile della resistenza al trimethoprim mentre *orfIN682* e *orfD* per delle ipotetiche proteine la cui funzione tuttavia è ad oggi sconosciuta.

Tutti gli isolati veicolanti le succitate strutture geniche hanno mostrato un profilo fenotipico di multifarmaco-resistenza e il *pattern* riscontrato più frequentemente è stato ChAmTeSul (24/52 ceppi; 46%) seguito da ChAmTeSulFen (14/52 ceppi; 27%), AmTeSulFen (11/52 ceppi; 21%) e

AmTeSul (3/52 ceppi; 6%) (Tabella A.8). Considerando invece le singole molecole, tutti i ceppi positivi agli integroni hanno mostrato resistenza nei confronti degli antimicrobici tetraciclina, ossitetraciclina, doxiciclina e al trisulfamidico, mentre sono risultati resistenti o intermedi agli aminoglicosidi streptomicina e neomicina.

Tabella A.8 Profili di multifarmaco-resistenza (MDR) dei ceppi di *E. coli* isolati da conigli commerciali (CC) positivi agli integroni e relativi geni-cassetta.

Specie Animale	Numero di ceppi di <i>E. coli</i>	Profilo di MDR	Geni-cassetta veicolati dagli integroni	Dimensione VR (pb)
CC	8	ChAmTeSulFen	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
CC	3	ChAmTeSulFen	<i>drA17-aadA5</i>	1500
CC	3	ChAmTeSulFen	<i>aadA1</i>	1000
CC	6	AmTeSulFen	<i>aadA1</i>	1000
CC	4	AmTeSulFen	<i>orfIN682-dfrA5-orfD</i>	1500
CC	1	AmTeSulFen	<i>ORFin682- dfrA5</i>	1000
CC	15	ChAmTeSul	<i>aadA1</i>	1000
CC	9	ChAmTeSul	<i>drrA1-aadA1</i>	1500
CC	2	AmTeSul	<i>aadA1</i>	1000
CC	1	AmTeSul	<i>dfrA1-aadA1</i>	1000

Legenda: Ch=chinoloni; Am=aminoglicosidi; Tet=tetraciclina; Sul=sulfamidici; Fen=fenicoli.

3A.2.2 *E. coli* isolati da conigli selvatici

Su un totale di 33 ceppi di *E. coli* testati, 15 sono risultati positivi agli integroni di classe 1 (45.5%) mentre nessuno è risultato positivo agli integroni di classe 2. Tutti i campioni provenivano da conigli selvatici isolati in Lombardia nel Parco del Fiume Serio.

Per quanto riguarda la caratterizzazione di queste strutture, l'amplificazione e il sequenziamento della regione variabile hanno evidenziato la presenza di frammenti di dimensioni comprese tra 1000 pb e 1500 pb e i geni riscontrati più frequentemente sono stati la combinazione *dfrA1-aadA1* (13/15 ceppi; 87%) e la singola cassetta genica *aa-*

dA1 (2/15; 13%), responsabili della resistenza alla streptomicina, spectinomomicina e al trimethoprim.

Tutti gli isolati positivi a queste strutture geniche hanno mostrato un profilo fenotipico di multifarmaco-resistenza e i *pattern* riscontrati sono stati ChAmTeSulFen (9/15 ceppi; 60%) e ChAmTeSul (6/15 ceppi; 40%) (Tabella A.9).

Considerando invece le singole molecole antimicrobiche, tutti i ceppi positivi agli integroni hanno mostrato resistenza nei confronti delle tetracicline, del trisulfamidico, del sulfamidico potenziato con il trimethoprim e dell'aminoglicoside streptomicina. Sono invece risultati resistenti o intermedi ad alcuni chinoloni di prima e seconda generazione quali l'acido nalidixico, la flumechina e l'enrofloxacin e all'aminoglicoside neomicina.

Tabella A.9 Profili di multifarmaco-resistenza (MDR) dei ceppi di *E. coli* isolati da conigli selvatici (CS) positivi agli integroni e relativi geni-cassetta.

Specie Animale	Numero di ceppi su <i>E. coli</i>	Profilo di MDR	Geni-cassetta veicolati dagli integroni	Dimensione VR (pb)
CS	7	ChAmTeSulFen	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
CS	2	ChAmTeSulFen	<i>aadA1</i>	1000
CS	6	ChAmTetSul	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500

Legenda: Ch=chinoloni; Am=aminoglicosidi; Te=tetracicline; Sul=sulfamidici; Fen=fenicoli.

3A.2.3 *E. coli* isolati da lepri

Dei 59 *E. coli* testati, 15 ceppi (25,4%) sono risultati positivi agli integroni di classe 1 mentre nessuno è risultato positivo agli integroni di classe 2. Tutti i ceppi veicolanti queste strutture sono stati isolati da lepri abbattute in Lombardia nella stagione venatoria 2006. Nessuno dei ceppi isolati da lepri di importazione ungheresi e sud-americane è risultato invece portatore di integroni.

La caratterizzazione della regione variabile di queste strutture ha permesso di evidenziare, come per gli integroni isolati dai conigli selvatici, la presenza di frammenti di dimensioni comprese tra 1000 pb e 1500 pb e la cassetta genica più frequente è stata *aadA1*, riscontrata in 9/15 ceppi (60%), seguita dalla combinazione dei geni *dfrA1-aadA1* (6/15; 40%), talvolta incompleti, responsabili della resistenza alla streptomicina, spectinomycin e al trimethoprim. Inoltre, la maggior parte dei ceppi (13/15; 87%) ha mostrato un *pattern* fenotipico di multifarmaco-resistenza e i profili riscontrati più frequentemente sono stati AmTeSul (5/15 ceppi; 33%) e ChAmTeSul (4/15 ceppi; 27%). Due ceppi sono invece risultati sensibili a tutte le molecole testate (Tabella A.10).

Considerando le singole molecole, tutti i ceppi positivi agli integroni sono risultati resistenti o intermedi nei confronti degli antimicrobici ossitetraciclina e neomicina e una percentuale elevata di ceppi nei confronti della streptomycin e del trisulfamidico (13/15; 87%), della doxicilina e tetraciclina (12/15; 80%) e dell'associazione del sulfametossazolo con il trimethoprim (8/15; 53%).

Tabella A.10 Profili di multifarmaco-resistenza (MDR) dei ceppi di *E. coli* isolati da lepri (Le) positivi agli integroni e relativi geni-cassetta.

Specie Animale	Numero di ceppi di <i>E. coli</i>	Profilo di MDR	Geni-cassetta veicolati dagli integroni	Dimensione VR (pb)
Le	1	ChAmTeSulFen	<i>aadA1</i>	1000
Le	1	AmTeSulFen	<i>aadA1</i>	1000
Le	2	ChAmTeSul	<i>aadA1</i>	1000
Le	2	ChAmTeSul	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
Le	3	AmTeSul	<i>aadA1</i>	1000
Le	2	AmTeSul	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
Le	1	TeSul	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
Le	1	AmSul	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
Le	2	-	<i>aadA1</i>	1000

Legenda: Ch=chinoloni; Am=aminoglicosidi; Te=tetracicline; Sul=sulfamidici; Fen=fenicoli.

3A.3 Plasmid Mediated Quinolone Resistance (PMQR)

3A.3.1 Presenza dei geni *qnr*, *qepA* e *oqxAB*

La ricerca dei geni PMQR (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, *oqxA* e *oqxB*) è stata condotta su tutti i 172 ceppi di *E. coli* oggetto di indagine. Nessuno degli isolati è risultato positivo ai geni *qnr* e *qepA* mentre 21 (12,2%) sono risultati positivi ai geni *oqxA* e *oqxB*. In particolare, 18 ceppi (85,7%) provenivano da conigli commerciali, 2 (9,5%) da lepri e 1 (4,8%) da un coniglio selvatico.

Nonostante *oqxA* e *oqxB* siano geni altamente conservati, il sequenziamento di una loro porzione di 325 pb e 480 pb ciascuno e il successivo confronto mediante allineamento delle sequenze nucleotidiche ottenute, hanno permesso di evidenziare la presenza di polimorfismi (SNPs) in entrambi i geni. In particolare, un ceppo isolato da un coniglio commerciale presentava, nel gene *oqxA*, 2 sostituzioni nucleotidiche (C con G e A con G) in posizione 31 e 148 rispetto alle sequenze dei geni *oqxA* riscontrati negli altri 20 ceppi e, nel gene *oqxB*, 3 sostituzioni (A con G, G con A e A con C) rispettivamente in posizione 156, 324 e 342.

Ad eccezione dei due ceppi di *E. coli* isolati da lepri, tutti gli isolati *oqxAB*-positivi presentavano fenotipi di multifarmaco-resistenza e la maggior parte (15/21 ceppi; 71,4%) risultava resistente a tutte le classi di antimicrobici testate. Inoltre, 16/21 ceppi (76%) risultavano positivi agli integroni di classe 1.

Considerando invece le singole molecole antimicrobiche, la maggior parte dei ceppi *oqxAB*-positivi (18/21; 85,7%) è risultata resistente all'acido nalidixico e alla flumechina, 16/21 (76,2%) all'enrofloxacin, 2/21 (9,5%) alla norfloxacin e 1/21 (4,8%) alla ciprofloxacin. Tuttavia, per quanto riguarda quest'ultima molecola, 11/21 (52,4%) ceppi ha presentato un profilo intermedio tra la resistenza e la sensibilità. Particolarmente interessante è notare come i ceppi sensibili all'acido nalidixico siano gli stessi sensibili alla flumechina (1 ceppo isolato da un coniglio selvatico e 2 da lepri), così come 3/5 sensibili all'enrofloxacin. Inoltre, i

ceppi che hanno mostrato resistenza agli altri fluorochinoloni di seconda generazione (ciprofloxacina e norfloxacina), risultavano resistenti a tutte le molecole appartenenti alla stessa classe.

Oltre alla resistenza ai chinoloni, tutti i ceppi *oqxAB*-positivi sono risultati resistenti o intermedi alle tetracicline e agli aminoglicosidi neomicina e streptomycin (ad eccezione di un ceppo per quest'ultima molecola, isolato da una lepre), mentre gli unici 3 ceppi sensibili al trisulfamidico erano 3/5 ceppi *oqxAB*-positivi risultati negativi agli integroni.

Tabella A.11 Profili di multifarmaco-resistenza (MDR) dei ceppi di *E. coli* *oqxAB* positivi e relativi geni-cassetta presenti negli integroni.

Specie Animale	Numero di ceppi di <i>E. coli</i>	Profilo di MDR	Geni-cassetta veicolati dagli integroni
CC	2	ChAmTeSulFen	<i>dfrA17-aadA5</i>
CC	6	ChAmTeSulFen	<i>dfrA1-aadA1</i>
CC	5	ChAmTeSulFen	<i>aadA1</i>
CC	1	ChAmTeSulFen	-
CS	1	ChAmTeSulFen	<i>dfrA1-aadA1</i>
CC	1	ChAmTeSul	<i>aadA1</i>
CC	1	ChAmTeSul	-
CC	1	AmTeSulFe	<i>aadA1</i>
CC	1	ChAmTe	-
Le	1	AmTe	-
Le	1	AmTe	-

Legenda: Ch=chinoloni; Am=aminoglicosidi; Te=tetracicline; Sul=sulfamidici; Fen=fenicoli; CC=coniglio commerciale; CS=coniglio selvatico; Le=lepre.

3A.4 Tipizzazione molecolare dei ceppi

3A.4.1 Multilocus Sequence Typing (MLST)

I ceppi di *E. coli* con particolari profili genotipici di antibiotico-resistenza (positività agli integroni e/o ai geni *oqxAB*) sono stati tipizzati mediante MLST. In tutto sono stati caratterizzati 55 ceppi isolati da conigli commerciali, 15 da conigli selvatici e 17 da lepri per un totale di 87 ceppi.

La caratterizzazione molecolare ha permesso di evidenziare la presenza di un'elevata eterogeneità tra gli *E. coli* considerati, indipendentemente dalla specie animale di origine.

Sono stati identificati 37 profili allelici diversi (ST) raggruppati in 8 complessi clonali (CC). Tuttavia, la maggior parte dei ST rilevati (28/37; 75,7%) non sono stati associati ad un CC poiché non ancora definito nel *database EcMLST*.

Il 32% dei ceppi di *E. coli* caratterizzati appartenevano ai CC17 (18/87; 20,7%) e CC31 (10/87; 11,5%). Infatti, 10/87 ceppi (11,5%) appartenevano a ST140, CC31 (8 isolati da conigli commerciali e due da lepri), 9/87 (10,3%) a ST238, CC17 (8 isolati da conigli commerciali e 1 da un coniglio selvatico) e 9/87 (10,3%) a ST119, CC17 (5 isolati da conigli commerciali e 4 da conigli selvatici). Inoltre, dei 59 ceppi restanti, 34 (57,6%) presentavano profili allelici nuovi non ancora presenti nell'*ecMLST database*. Grazie a questo studio è stato infatti possibile riconoscere 22 nuovi ST, identificati con una numerazione progressiva dal 1004 al 1025 (ST1004-ST1025). Ad oggi, nessuno di questi ST è stato associato ad un CC.

Per quanto riguarda gli *E. coli* isolati da conigli di allevamento, la maggior parte dei ceppi (26/55; 47,2%) appartenevano a ST140 (8/55; 14,5%), ST238 (8/55; 14,5%), ST119 (5/55; 9%) e ST1007 (5/55; 9%).

Gli 8 ceppi ST140 provenivano da conigli di allevamenti di Piemonte e Lombardia campionati nel biennio 2006-2007. Quattro di questi ceppi, isolati tutti nel 2006 da allevamenti piemontesi, presentavano lo stesso profilo di multifarmaco-resistenza (AmTeSulFen) e la stessa combina-

zione di cassette geniche contenuta nella regione variabile degli integroni di classe 1 (*orfIN682-dfrA5-orfD*). Un altro ceppo, isolato nello stesso anno ma in Lombardia, presentava fenotipi di resistenza del tutto simili ai precedenti, ad eccezione del contenuto della regione variabile dell'integrone che risultava invece priva della cassetta genica *orfD*. Gli altri 3 ceppi ST140 sono stati isolati da animali di allevamenti di Lombardia (nel 2006) e Piemonte (nel biennio 2006-2007). I due ceppi isolati nel 2006 nelle due Regioni hanno mostrato lo stesso profilo fenotipico e genotipico di antibiotico-resistenza: entrambi presentavano infatti il *pattern* di multifarmaco-resistenza ChAmTeSul e il gene *aadA1* nella regione variabile degli integroni. Il ceppo isolato invece in Piemonte nel 2007 presentava il *pattern* AmTeSul e la combinazione dei geni *dfrA1-aadA1* (Tabella A.12).

Per quanto riguarda i ceppi ST238, essi provenivano da allevamenti lombardi, piemontesi e veneti campionati nel biennio 2006-2007. Cinque di questi isolati presentavano lo stesso profilo fenotipico di multifarmaco-resistenza, ChAmTeSul, e il gene *aadA1* nella regione variabile dell'integrone, ad eccezione di un unico ceppo nella cui regione variabile era presente la combinazione *dfrA1-aadA1*. I rimanenti tre ceppi presentavano, da un punto di vista fenotipico, resistenza a tutte e 5 le classi di antimicrobici testate (ChAmTeSulFen) e le combinazioni dei geni *dfrA-aadA* nelle varianti *dfrA17-aadA5* (in 2 ceppi isolati in Veneto nel 2007) e *dfrA1-aadA1* (in 1 ceppo isolato in Piemonte nel 2007) nei rispettivi integroni (Tabella A.12).

I ceppi ST119, isolati da conigli di allevamenti veneti e lombardi campionati nel biennio 2006-2007, presentavano tutti lo stesso profilo fenotipico e genotipico di antibiotico-resistenza, rispettivamente ChAmTeSul e la combinazione genica *dfrA1-aadA1* negli integroni. Unica eccezione, il ceppo positivo ai geni PMQR *oqxAB* che presentava il *pattern* di multifarmaco-resistenza ChAmTe (Tabella A.12).

I 5 ceppi ST1007, isolati in Lombardia nel 2006, presentavano resistenza fenotipica a tutte le classi di molecole antimicrobiche testate (ChAm-

TeSulFen) e la stessa cassetta genica, *aadA1*, nella regione variabile degli integroni (Tabella A.12).

Per quanto riguarda i ceppi isolati da conigli selvatici, essi provenivano da animali campionati nel 2006 in Lombardia nel parco del Fiume Serio. Sono stati identificati 7 ST diversi e i profili allelici ST1014 (6/15; 40%) e ST119 (4/15; 26,6%) i più rappresentati. In particolare, i ceppi ST1014 presentavano tutti lo stesso resistotipo sia fenotipico (ChAmTeSul) che genotipico (*dfrA1-aadA1* nella regione variabile degli integroni). Analogamente, anche i ceppi ST119 presentavano lo stesso fenotipo di antibiotico-resistenza (ChAmTeSulFen) e la stessa combinazione genica nella regione variabile degli integroni (*dfrA1-aadA1*) (Tabella A.13).

Due ceppi, ciascuno con profilo allelico ST148 e ST1006, presentavano un profilo fenotipico e genotipico del tutto analogo ad alcuni *E. coli*, con medesimo ST, isolati dai lagomorfi commerciali nella stessa Regione. Diversamente, i ceppi ST119 e ST238 isolati sia da lagomorfi domestici che selvatici, mostravano profili di antibiotico-resistenza particolarmente variabili anche all'interno della stessa specie animale di provenienza (Tabella A.13).

Infine, per quanto riguarda gli *E. coli* isolati da lepri, tutti i ceppi provenivano da animali abbattuti nella stagione venatoria 2006 in Lombardia.

La caratterizzazione molecolare dei ceppi ha evidenziato un'elevata eterogeneità all'interno di questa popolazione. Infatti, su un totale di 17 ceppi analizzati, sono stati identificati 14 ST diversi e i profili allelici riscontrati con maggiore frequenza sono stati ST1008 (3/17; 17,6%) e ST140 (2/17; 11,8%). Diversamente da quanto riscontrato per alcuni ST di ceppi isolati da conigli domestici e selvatici, i ceppi isolati da questa specie animale, pur presentando lo stesso profilo allelico, differivano tra loro per resistotipo fenotipico e/o genotipico. Inoltre, come per alcuni ceppi isolati da conigli selvatici, anche nei ceppi isolati da lepri sono stati riscontrati ST comuni agli *E. coli* isolati da lagomorfi domestici, in particolare ST140 ed ST259 (Tabella A.14).

Tabella A.12 Profili allelici (ST) e relativi complessi clonali (CC) dei ceppi di *E. coli* isolati da conigli commerciali (CC) e campionati in allevamenti di Lombardia (L), Piemonte (P) e Veneto (V) negli anni 2006-2007.

Specie Animale	Anno di Isolamento	Origine	Numero di ceppi si <i>E. coli</i>	ST	CC	Profilo AMR	geni-cassetta veicolati dagli integroni
CC	2006	P/L	5	140	31	AmTeSulFen	<i>orfIN682 + dfrA5 + (orfD)</i>
CC	2006	P/L	2	140	31	ChAmTeSul	<i>aadA1</i>
CC	2007	P	1	140	31	AmTeSul	<i>dfrA1-aadA1</i>
CC	2006-2007	V/L	4	238	17	ChAmTeSul	<i>aadA1</i>
CC	2007	P	1	238	17	ChAmTeSul	<i>dfrA1-aadA1</i>
CC	2006-2007	V/P	3	238	17	ChAmTeSulFen	<i>dfrA1-aadA1; dfrA17-aadA5</i>
CC	2006	L	5	1007	N/A	ChAmTeSulFen	<i>aadA1</i>
CC	2006-2007	V/L	4	119	17	ChAmTeSul	<i>dfrA1-aadA1</i>
CC	2007	L	1	148	63	ChAmTeSulFen	<i>aadA1</i>
CC	2007	L	2	148	63	ChAmReSul	<i>aadA1</i>
CC	2006	L	1	1005	N/A	ChAmTeSulFen	<i>dfrA1-aadA1</i>
CC	2006-2007	L	3	1006	N/A	ChAmTeSulFen	<i>dfrA1-aadA1</i>
CC	2006-2007	L	2	1019	N/A	ChAmTeSulFen	<i>dfrA1-aadA1</i>
CC	2007	L	1	1019	N/A	AmTeSul	<i>aadA1</i>
CC	2007	V	1	1021	N/A	ChAmTeSul	<i>aadA1</i>
CC	2007	L	2	461	41	ChAmTeSul	<i>aadA1</i>
CC	2006	L	1	1004	N/A	ChAmTeSul	<i>dfrA1-aadA1</i>
CC	2006	L	1	1004	N/A	AmTeSul	<i>aadA1</i>
CC	2006-2007	L	2	1011	N/A	ChAmTeSul	<i>aadA1</i>
CC	2006	V/L	2	1012	N/A	ChAmTeSulFen	<i>aadA1</i>
CC	2006-2007	V/L	2	1018	N/A	ChAmTeSulFen	<i>aadA1</i>
CC	2006	L	1	134	30	AmTeSulFen	<i>aadA1</i>
CC	2006	L	1	259	N/A	ChAmTeSul	<i>aadA1</i>
CC	2006	V	1	317	N/A	ChAmTeSul	<i>dfrA1-aadA1</i>
CC	2006	L	1	855	N/A	ChAmTeSul	<i>dfrA1-aadA1</i>
CC	2007	L	1	1017	N/A	ChAmTeSulFen	<i>dfrA1-aadA1</i>
CC	2006	L	1	1020	N/A	ChAmTeSul	<i>aadA1</i>
CC	2007	V	1	1021	N/A	ChAmTeSul	<i>aadA1</i>
CC	2007	L	1	119	17	ChAmTe	-
CC	2008	L	1	1021	N/A	ChAmTeSulFen	-
CC	2008	L	1	857	N/A	ChAmTeSul	-

Legenda: Ch=chinoloni; Am=aminoglicosidi; Te=tetracicline; Sul=sulfamidici; Fen= fenicoli; N/A= non assegnato.

Tabella A.13 Profili allelici (ST) e relativi complessi clonali (CC) dei ceppi di *E. coli* isolati da conigli selvatici (CS).

Specie Animale	Anno di Isolamento	Origine	Numero di ceppi si <i>E. coli</i>	ST	CC	Profilo AMR	geni-cassetta veicolati dagli integroni
CS	2006	L	6	1014	N/A	ChAmTeSul	<i>dfrA1-aadA1</i>
CS	2006	L	4	119	17	ChAmTeSulFen	<i>dfrA1-aadA1</i>
CS	2006	L	1	148	63	ChAmTeSulFen	<i>aadA1</i>
CS	2006	L	1	238	17	ChAmTeSulFen	<i>dfrA1-aadA1</i>
CS	2006	L	1	1006	N/A	ChAmTeSulFen	<i>dfrA1-aadA1</i>
CS	2006	L	1	1013	N/A	ChAmTeSulFen	<i>dfrA1-aadA1</i>
CS	2006	L	1	1016	N/A	ChAmTeSulFen	<i>aadA1</i>

Tabella A.14 Profili allelici (ST) e relativi complessi clonali (CC) dei ceppi di *E. coli* isolati da lepri (Le).

Specie Animale	Anno di Isolamento	Origine	Numero di ceppi si <i>E. coli</i>	ST	CC	Profilo AMR	geni-cassetta veicolati dagli integroni
Le	2006	L	1	1008	N/A	ChAmTeSul	<i>aadA1</i>
Le	2006	L	1	1008	N/A	ChAmTeSul	<i>dfrA1-aadA1</i>
Le	2006	L	1	1008	N/A	AmTeSul	<i>dfrA1-aadA1</i>
Le	2006	L	1	140	31	ChAmTeSul	<i>aadA1</i>
Le	2006	L	1	140	31	AmTeSul	<i>aadA1</i>
Le	2006	L	1	23	7	AmTeSul	<i>dfrA1-aadA1</i>
Le	2006	L	1	144	36	ChAmTeSulFen	<i>aadA1</i>
Le	2006	L	1	145	31	ChAmTeSul	<i>dfrA1-aadA1</i>
Le	2006	L	1	171	23	ChAmTeSulFen	<i>aadA1</i>
Le	2006	L	1	259	N/A	-	<i>aadA1</i>
Le	2006	L	1	690	31	AmSul	<i>dfrA1-aadA1</i>
Le	2006	L	1	1009	N/A	AmTeSul	<i>aadA1</i>
Le	2006	L	1	1010	N/A	AmTeSulFen	<i>aadA1</i>
Le	2006	L	1	1022	N/A	-	<i>aadA1</i>
Le	2006	L	1	1023	N/A	AmTeSul	<i>aadA1</i>
Le	2006	L	1	1024	N/A	AmTe	-
Le	2006	L	1	1025	N/A	AmTe	-

Legenda: Ch=chinoloni; Am=aminoglicosidi; Te=tetracicline; Sul=sulfamidici; Fen=fenicoli; L=Lombardia; N/A= non assegnato.

3A.4.1 Analisi filogenetica

L'analisi filogenetica è stata eseguita utilizzando le sequenze nucleotidiche concatenate dei 7 *loci* genici analizzati mediante MLST di ciascun ceppo. Dall'allineamento eseguito sfruttando l'algoritmo MAFFT con il *software* Guidance (Penn *et al*, 2010), è stato possibile ottenere l'albero filogenetico rappresentato in figura A.1. Ciascun ceppo è stato identificato con il proprio ID (numero di identificazione), la specie animale di origine (FR=coniglio commerciale, WR=coniglio selvatico e H=lepre) e il ST di appartenenza.

L'albero può essere diviso in 3 gruppi principali, A, B e C e la maggior parte dei ceppi oggetto di questa indagine (62/87; 71,2%) apparteneva al gruppo C, supportato da un elevato valore di *bootstrap* (99). I restanti campioni si inserivano nei due gruppi A (16/87; 18,4%) e B (9/87; 10,4%), anch'essi supportati da valori di *bootstrap* maggiori di 90.

Al gruppo A appartenevano ceppi isolati sia da lagomorfi commerciali (ST259, ST317, ST857, ST1011, ST1019 e ST1020) che da lepri (ST23, ST259, ST690, ST1008 e ST1022), mentre in questo *cluster* non è stata riscontrata la presenza di *E. coli* isolati da conigli selvatici.

Nel gruppo B invece, il meno numeroso, sono stati riscontrati soprattutto ceppi isolati da conigli selvatici (6/9; 33%) appartenenti al ST1014 e 3 ceppi (1 isolato da una lepre e 2 da conigli commerciali), con ST1025, ST1005 e ST1017.

La maggior parte dei ceppi isolati dai conigli commerciali (43/55; 78,2%), si inseriva invece nel gruppo C, in particolare i ceppi appartenenti ai CC 17 (ST238, ST119), CC31 (ST140) ed ST1007. In questo *cluster* sono presenti anche i ceppi isolati da animali a vita libera, in particolare gli isolati da conigli selvatici con ST238, ST119, ST148, ST1006, ST1013, ST1015 e ST1016 e da lepri con ST171, ST140, ST144, ST145, ST1009, ST1010, ST1023 e ST1024.

In particolare, ST più diffusi (ST238, ST119 e ST1007) sembrano essere filogeneticamente correlati tra loro, tanto da formare il sotto-gruppo più rappresentato del gruppo C.

I ceppi di *E. coli* *oqxAB*-positivi, pur essendo presenti prevalentemente nel gruppo C (e in particolare nel sotto-gruppo più rappresentato, 11/21; 52,38%), si riscontrano anche nel *cluster* A (3 ceppi con ST1019 e 2 rispettivamente con ST1019 e ST857) e nel *cluster* B (1 ceppo isolato da una lepre con ST1025).

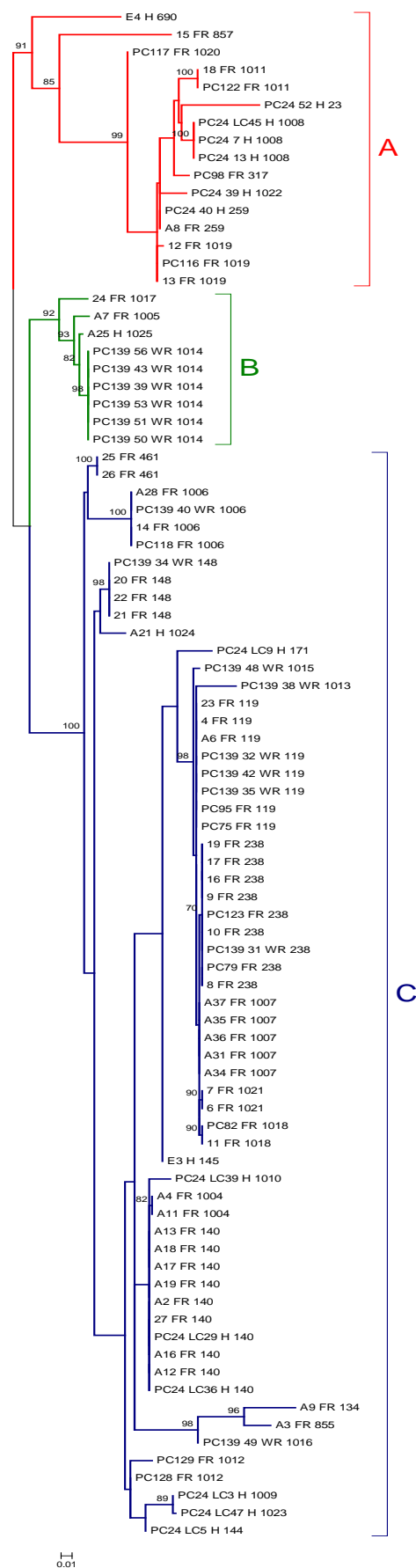


Figura A.1 Dendrogramma dei ceppi di *E. coli* caratterizzati mediante MLST e sua suddivisione in 3 *cluster* principali (A, B e C).

3A.5 Tipizzazione plasmidica

L'analisi del profilo plasmidico mediante PBRT è stata eseguita su una selezione di *E. coli* scelti in base alla specie animale da cui sono stati isolati, al loro profilo fenotipico e genotipico di antibiotico-resistenza (con particolare riguardo ai ceppi *oqxAB*-positivi) e al ST e/o CC d'appartenenza, tali da poter essere considerati ceppi rappresentativi della maggioranza della popolazione batterica oggetto di studio.

Sono stati testati 30 ceppi, 23/30 (76,7%) isolati da conigli commerciali, 5/30 (16,7%) da lepri e 2/30 (6,6%) da conigli selvatici e di questi, 21 erano portatori dei geni PMQR *oqxA* e *oqxB* (Tabella A.15).

L'indagine ha permesso di evidenziare la presenza di un'ampia varietà di classi plasmidiche nella maggioranza dei ceppi testati. Infatti, soltanto un ceppo, A6 (ST119, CC17), veicolava un solo *replicon-type* (*incR*) dei 22 cercati. I restanti 29 ceppi invece, indipendentemente dalla loro origine geografica e dalla specie animale da cui sono stati isolati, hanno presentato da un minimo di 2 ad un massimo di 7 repliconi diversi. Sono risultati particolarmente diffusi i gruppi *IncF*, *IncHI1*, *IncI1*, *IncN*, *IncP*, *IncX1*, *IncY* e *ColE*. Ad eccezione di A6, tutti sono risultati positivi ad *IncF*, soprattutto per la presenza di *repF* (26/30; 86,7%) spesso associato ad altri repliconi della stessa famiglia *FIA*, *FIB* e/o *FIC* (22/30; 73,3%). Diffuso anche *incI1*, presente in 26/30 (86,7%) ceppi, tutti, ad eccezione di uno (il ceppo 6), positivi agli integroni di classe 1. La presenza dei repliconi *incX1*, *IncP* e *IncY* è stata riscontrata rispettivamente in 13/30 (43,3%), 11/30 (36,7%) e 9/30 (30%) ceppi mentre *ColE* in 5/30 (16,7%) ceppi. Non è emersa nessuna associazione tra la presenza di alcuni plasmidi e l'appartenenza dei ceppi a particolari ST o CC.

Ciò che emerge è la prevalenza, nei ceppi *oqxAB*-positivi (segnati con un asterisco in tabella A.15), del CC17 (9/21; 42,8%), ST238 (7/21 ceppi; 33,3%) ST119 (2/21; 9,5%) e la loro positività soprattutto ai plasmidi appartenenti alla famiglia *IncF* (20/21; 95,2%), *IncI1* (17/21; 81%), *IncY* (9/21; 42,8%), *IncP* (7/21; 33,3%) e *IncX1* (5/21; 23,8%).

Tabella A.15 Profilo plasmidico dei ceppi di *E. coli* rappresentativi della popolazione in esame.

Specie Animale	ID	Origine e anno	ST	Complesso Clonale (CC)	Profilo AMR	geni-cassetta veicolati dagli integroni	Profilo plasmidico
CC	4*	V-2007	119	17	ChAmTeSulFe	<i>dfrA1-aadA1</i>	F, FIB, I1, P
CC	A6*	L-2007	119	17	ChAmTe	-	R
CC	PC75	V-2006	119	17	ChAmTeSulFe	<i>dfrA1-aadA1</i>	FIB, I1, P
CC	A2	P-2006	140	31	ChAmTeSulFe	<i>dfrA1-aadA1</i>	F, I1, X1, ColE
Le	E3	L-2006	145	31	ChAmTeSulFe	<i>aadA1</i>	F, FIB, I1, X1, ColE
CC	20	L-2007	148	63	ChAmTeSulFe	<i>dfrA1-aadA1</i>	F, FIB, I1, P, X1
CS	PC139-34	L-2006	148	63	ChAmTeSulFe	-	F, FIB, I1, P, X1
CC	PC79*	L-2006	238	17	ChAmTeSulFe	<i>dfrA17-aadA5</i>	F, FIC, I1, Y, ColE
CC	8*	V-2007	238	17	ChAmTeSulFe	<i>dfrA17-aadA5</i>	F, FIC, HI1, I1, Y
CC	9*	V-2007	238	17	ChAmTeSulFe	<i>aadA1</i>	F, FIC, I1, Y
CC	10*	V-2007	238	17	ChAmTeSulFe	<i>aadA1</i>	F, FIC, I1, Y
CC	17*	P-2007	238	17	ChAmTeSulFe	<i>dfrA1-aadA1</i>	F, FIC, I1, N, X1, Y
CS	139-31*	L-2006	238	17	ChAmTeSulFe	<i>dfrA1-aadA1</i>	F, FIC, HI1, I1, P, Y
CC	19*	L-2007	238	17	ChAmTeSulFe	<i>aadA1</i>	FIB, FIC, I1, Y
Le	E4	L-2006	690	31	ChAmTeSulFe	<i>dfrA17-aadA5</i>	F, I1, X1
CC	15*	L-2008	857	N/A	ChAmTeSul	-	F, FIA, FIB
CC	A4	L-2006	1004	N/A	ChAmTeSulFe	<i>dfrA17-aadA5</i>	F, I1, P, X1, ColE
CC	A28*	L-2006	1006	N/A	ChAmTeSulFe	<i>dfrA1-aadA1</i>	F, FIB, HI1, I1, P, X1, ColE
CC	PC118*	L-2006	1006	N/A	ChAmTeSulFe	<i>dfrA1-aadA1</i>	F, I1, N, P, X1
CC	PC116*	L-2006	1019	N/A	ChAmTeSulFe	<i>dfrA1-aadA1</i>	F, FIB, I1, N, P, X1
Le	PC24LC39	L-2006	1010	N/A	ChAmTe	<i>aadA1</i>	F, I1, X1
CC	18*	L-2007	1011	N/A	ChAmTeSul	<i>aadA1</i>	F, FIB, FIC, I1, Y
CC	24	L-2007	1017	N/A	ChAmTeSulFe	<i>dfrA1-aadA1</i>	F, I1, X1
CC	11*	L-2007	1018	N/A	ChAmTeSulFe	<i>aadA1</i>	F, FIC, I1
CC	12*	L2007	1019	N/A	ChAmTeSulFe	<i>dfrA1-aadA1</i>	FIB, I1, N, P, X1
CC	13*	L-2007	1019	N/A	AmTeSulFe	<i>aadA1</i>	F, I1, P
CC	6*	L-2008	1021	N/A	ChAmTeSulFe	-	F, FIC, I1
CC	7*	V-2007	1021	N/A	ChAmTeSulFe	<i>aadA1</i>	F, FIC, I1, Y
Le	A21*	L-2007	1024	N/A	AmTe	-	F, FIB
Le	A25*	L-2007	1025	N/A	AmTe	-	F, FIB

Legenda: Ch=chinoloni; Am=aminoglicosidi; Te=tetracicline; Sul=sulfamidici; Fen= fenicoli; CC= coniglio commerciale, CS= coniglio selvatico; Le= lepre; L=Lombardia; P=Piemonte; V=Veneto; N/A= non assegnato; *ceppi *oqxAB*-positivi. ID=numero identificativo.

3A.6 Trasformazione batterica

La trasformazione di cellule batteriche competenti è stata eseguita utilizzando il DNA plasmidico di 2 ceppi (ID 20 e PC75) isolati da 2 conigli commerciali. Questi due ceppi sono stati scelti tra i campioni risultati positivi agli integroni di classe 1 e ai plasmidi IncI1, essendo quest'ultima la famiglia di plasmidi più diffusa tra i ceppi risultati positivi a queste strutture. Infatti, dei 30 ceppi su cui è stata eseguita la tipizzazione del contenuto plasmidico, 26 sono risultati positivi ad IncI1 mentre i 4 che non presentavano questa classe, erano 4/5 ceppi testati negativi agli integroni. L'obiettivo è stato quindi verificare se tali strutture fossero (o meno) veicolate da questi plasmidi. Pertanto è stata ripetuta la ricerca di queste strutture mediante PCR *end-point* sul DNA delle cellule batteriche trasformanti e l'analisi ha dato esito positivo sia agli integroni che ai plasmidi IncI1 e IncP.

4A. Discussione

4A.1 Profili fenotipici di antibiotico-resistenza

L'analisi dei profili fenotipici di antibiotico-resistenza è stata eseguita in ceppi di *E. coli* EPEC isolati da conigli da carne e in *E. coli* commensali da lagomorfi selvatici.

Il pannello di antimicrobici testato è stato scelto in modo tale che fossero rappresentate le classi di molecole più comunemente utilizzate nella terapia delle infezioni in medicina umana e nella profilassi e trattamento delle enteropatie nell'allevamento cunicolo. A queste, sono state aggiunte molecole in disuso da diverso tempo, come il cloramfenicolo, per verificare la sensibilità di *E. coli* a principi attivi il cui utilizzo è stato vietato da molti anni. Sono state invece escluse dall'analisi le penicilline in quanto sono principi attivi che non vengono utilizzati nella produzione del coniglio da carne perché nocivi per i lagomorfi.

L'analisi dei profili di antibiotico-resistenza ha evidenziato come la maggior parte dei ceppi, isolati sia da lagomorfi domestici che selvatici, sia resistente ad almeno 3 delle 5 classi di antimicrobici testate.

Livelli di resistenza particolarmente elevati sono stati riscontrati in particolare nei ceppi isolati dai conigli di allevamento, soprattutto nei confronti delle principali classi di molecole utilizzate a scopo profilattico e terapeutico per le patologie enteriche del coniglio (aminoglicosidi, tetraciclina e sulfamidici). In questa tipologia d'allevamento, è particolarmente diffuso l'impiego di antimicrobici a scopo metafilattico durante le fasi considerate più critiche, soprattutto lo svezzamento. La somministrazione di antimicrobici a basso dosaggio infatti è una prassi comune in quanto previene l'insorgenza di enteropatie che non solo pregiudicano lo stato di salute e quindi di benessere degli animali, ma si ripercuotono soprattutto sulle loro *performance* produttive in termini di accrescimento e mortalità. Più del 50% delle perdite economiche che si verificano durante il ciclo produttivo sono infatti imputabili a patologie di origine

batterica a carico dell'apparato gastro-intestinale del coniglio (Grilli, 2006; Grilli, 2008).

Più della metà dei ceppi di *E. coli* EPEC isolati da animali provenienti da allevamenti del Nord-Italia e deceduti naturalmente per enteropatie riconducibili a colibacillosi, ha mostrato resistenza ad almeno una delle molecole appartenenti alla classe delle tetracicline, degli aminoglicosidi, dei sulfamidici e dei chinoloni (Tabella A.6).

Livelli di resistenza particolarmente elevati sono stati riscontrati soprattutto nei confronti degli aminoglicosidi neomicina e streptomicina per i quali la quasi totalità dei ceppi è risultato resistente. Tuttavia resistenze comunque importanti sono state riscontrate anche nei confronti dell'aminosidina e dell'apramicina, farmaci il cui utilizzo è comune negli allevamenti cunicoli in combinazione con le tetracicline. Nei piani di metafilassi è infatti diffuso l'impiego dell'aminosidina e dell'apramicina in combinazione con l'ossitettraciclina oppure con i sulfamidici potenziati con le diaminopirimidine (trimethoprim).

Non sorprende il riscontro di resistenze elevate nei confronti di tutte le molecole testate appartenenti alla classe delle tetracicline. E' ampiamente documentata infatti la resistenza pressochè totale a questi antimicrobici a seguito del loro ampio utilizzo per patologie diverse da quelle enteriche (respiratorie, per esempio), tanto da essere oramai sconsigliati come presidio terapeutico per il trattamento delle infezioni sostenute dai batteri gram-negativi (Sojca and Carmagha, 1962; Wilkenson *et al.*, 2004).

A destare certamente più preoccupazione è la resistenza nei confronti dei chinoloni sia nei ceppi isolati dai conigli domestici che selvatici. Livelli di resistenza importanti sono stati riscontrati infatti nei confronti dei chinoloni e fluorochinoloni di prima e seconda generazione quali l'acido nalidixico, la flumechina, l'enrofloxacin e la ciprofloxacina. Soltanto il 34% dei ceppi isolati in allevamento e il 21% degli isolati da animali a vita libera è infatti risultato sensibile all'enrofloxacin, fluoro-chinolone il cui utilizzo è consentito nell'allevamento cunicolo. Ancora

più allarmante è riscontrare sensibilità nei confronti della ciprofloxacina in una percentuale di ceppi che non supera il 60% sia negli animali domestici che nei conigli selvatici. Questo fluorochinolone, ad uso esclusivamente umano, è infatti considerato uno degli antimicrobici di prima scelta per la terapia delle infezioni. Interessante è inoltre sottolineare che circa il 70% dei ceppi ha mostrato resistenza o una sensibilità intermedia nei confronti del cloramfenicolo nonostante il suo utilizzo in medicina veterinaria sia stato bandito ormai da diversi anni.

In una percentuale di ceppi certamente più contenuta, anche gli *E. coli* isolati da lepri selvatiche hanno mostrato resistenza oppure una sensibilità intermedia nei confronti delle tetracicline, del trisulfamidico e degli aminoglicosidi streptomina, neomicina e amikacina.

Questi dati fotografano un *trend* particolarmente preoccupante, in linea se non peggiore sia con quanto riportato in altri studi sull'antibiotico-resistenza di *E. coli* negli allevamenti cunicoli italiani e nei lagomorfi selvatici, sia con i *report* dell'EFSA e dell'ECDC sulla diffusione del fenomeno nell'uomo e nelle produzioni animali (Camarda *et al.*, 2004; Agnoletti *et al.*, 2004; Pisoni *et al.*, 2004; Grilli, 2008; Poeta *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010; EFSA and ECDC, 2012; ECDC, 2012).

Infatti, nel recente *report* dell'EFSA con l'ECDC riferiti all'anno 2010 e nella relazione dell'ECDC al 2011, i dati più allarmanti per quanto riguarda i batteri gram-negativi sia patogeni che commensali, si riferiscono soprattutto alle resistenze spesso combinate nei confronti degli aminoglicosidi, β -lattamici, fluorochinoloni, tetracicline e sulfamidici, in percentuali e associazioni diverse a seconda dell'origine dei ceppi (umana o animale) (EFSA and ECDC, 2012; ECDC, 2012).

Nonostante il contesto ambientale in cui vivono i lagomorfi selvatici rispetto ai conigli di allevamento sia diverso, la maggior parte dei ceppi di *E. coli* isolati da queste specie animali ha mostrato profili di antibiotico-resistenza, talvolta addirittura con livelli più elevati rispetto ai conigli di allevamento. Quest'ultima osservazione si riferisce soprattutto ai ceppi isolati dai conigli selvatici, i quali hanno mostrato livelli di resistenza

superiori rispetto agli isolati da animali domestici nei confronti della streptomicina, apramicina, sulfamidici e chinoloni. Tuttavia, per la scarsa numerosità dei ceppi testati e per l'area geografica limitata in cui sono stati eseguiti i campionamenti, questi confronti sono da ritenersi delle considerazioni di carattere generale.

Il riscontro di resistenze a molecole antimicrobiche ormai in disuso, come nel caso del cloramfenicolo e di alcuni aminoglicosidi, indica che, una volta acquisita la resistenza, essa può permanere a lungo nei batteri anche in assenza di una pressione selettiva esercitata dal farmaco. Parallelamente, la presenza di ceppi resistenti a molecole antimicrobiche mai utilizzate negli animali da cui sono stati isolati (come la ciprofloxacina nei conigli d'allevamento e selvatici), oltre a possibili fenomeni di cross-resistenza all'interno della stessa classe di molecole, conferma la grande plasticità dei batteri, capaci di acquisire da altri microorganismi e di diffondere a loro volta, tratti di DNA utili per la sopravvivenza in condizioni ambientali sempre nuove, in particolare attraverso il trasferimento orizzontale di geni di virulenza e di antibiotico-resistenza (Carattoli, 2003; Perry, 2004; Dobrindt *et al.*, 2002; Carattoli, 2009).

Lo studio è stato rivolto alla ricerca e caratterizzazione delle principali strutture genetiche (integroni e plasmidi) coinvolte nell'acquisizione e nel trasferimento di determinanti genici di antibiotico-resistenza nelle *Enterobacteriaceae*.

4A.2 Profili genotipici di antibiotico-resistenza

La presenza degli integroni di classe 1 è stata riscontrata in ceppi di *E. coli* isolati da tutte e tre le specie animali campionate, con una prevalenza maggiore negli isolati da conigli commerciali, mentre nessun ceppo è risultato portatore degli integroni di classe 2. Questo dato è in accordo con quanto già riferito in letteratura, secondo cui queste strutture si riscontrano meno frequentemente rispetto agli integroni di classe 1 e solo pochi Autori riportano di ceppi positivi ad entrambe le classi (Ra-

dstrom *et al.*, 1994; Collis and Hall, 1995; Ploy *et al.*, 2000b; Fluit and Schmitz, 2004; Rodriguez *et al.*, 2006; Mazel, 2006; Vinuè *et al.*, 2008; Stephenson and Brown, 2012).

La cassetta genica riscontrata più frequentemente è stata *aadA* (nelle varianti alleliche *aadA1* e *aadA5*) da sola o in combinazione con il gene *dfrA* (*dfrA1* e *dfrA17*) responsabili rispettivamente della resistenza ad alcuni aminoglicosidi (streptomicina e spectinomicina) e al trimethoprim. La presenza di un numero limitato di cassette geniche è in accordo con quanto emerge nella maggior parte degli articoli presenti in letteratura. Infatti, nonostante ad oggi siano state descritte più di 130 cassette diverse in grado di conferire resistenza a quasi tutte le classi di antimicrobici, i geni che si riscontrano più frequentemente negli integroni di classe 1 sono *dfrA* e *aadA* (Fluit and Schmitz, 2004; Lapierre *et al.*, 2008; Partridge *et al.*, 2009; Forcella *et al.*, 2010; Barraud *et al.*, 2010; Ponce-Rivas *et al.*, 2012).

E' inoltre importante ricordare che gli integroni di classe 1 in quanto tali presentano nella propria regione conservata all'estremità CS3' i geni *qacEA1* e *sul1*, in grado di conferire resistenza ai composti dell'ammonio quaternario, utilizzati come disinfettanti negli allevamenti intensivi, e ai sulfamidici (Carattoli, 2001).

Un dato particolarmente interessante è la presenza di queste strutture in ceppi di *E. coli* con profili fenotipici di multifarmaco-resistenza. La maggior parte dei ceppi batterici isolati da conigli, sia domestici che selvatici, ha infatti mostrato resistenza a tutte e 5 le classi di antimicrobici testate, mentre gli isolati da lepri soprattutto nei confronti degli aminoglicosidi, sulfamidici e tetracicline. Unica eccezione due ceppi che, nonostante veicolino il gene *aadA1* nel proprio integrone, hanno mostrato sensibilità a tutte le molecole testate. Un'analisi più dettagliata della sequenza nucleotidica codificante di queste cassette geniche ha tuttavia permesso di evidenziare come alcune siano incomplete, probabilmente a causa di errori di arrangiamento durante la loro acquisizione o escissione mediate dall'integrasi. Ciò spiegherebbe quindi la mancata corri-

spondenza tra profilo fenotipico di antibiotico-resistenza e la presenza di particolari cassette geniche negli integroni. Viceversa, alcuni ceppi veicolanti i geni *dfrA* e *aadA* completi, non hanno mostrato fenotipicamente resistenza agli aminoglicosidi e/o all'associazione del sulfametossazolo con il trimethoprim. Questa discordanza può essere dovuta a mutazioni nucleotidiche all'interno della sequenza codificante dei geni oppure a carico del promotore tali da impedirne una corretta espressione.

Parallelemente, il riscontro di ceppi con fenotipi di resistenza a queste molecole ma privi di integroni, indica la probabile presenza di altre strutture o l'intervento di meccanismi genetici diversi tali da rendere inefficaci questi antimicrobici. Non di rado infatti, i batteri presentano più di un meccanismo responsabile di resistenza ad una molecola o ad una classe di molecole antimicrobiche (Spratt, 1994; McDermott *et al.*, 2003; Magnet and Blanchard, 2005; Wright, 2005).

Considerando i singoli principi attivi, la maggior parte dei ceppi positivi a queste strutture isolati sia da lagomorfi commerciali che selvatici, sono risultati resistenti o intermedi nei confronti delle tetracicline (tetraciclina, ossitetraciclina e doxiciclina), del trisulfamidico e del sulfamidico potenziato con il trimethoprim, della streptomina e dei chinoloni e fluorochinoloni di prima e seconda generazione, in particolare l'acido nalidixico, la flumechina e l'enrofloxacin.

Stante la maggior parte degli isolati appartenga ai complessi clonali CC17 e CC31, la tipizzazione molecolare ha permesso di evidenziare la presenza di un'elevata eterogeneità tra i ceppi *intI1*-positivi, indipendentemente dalla specie animale e dall'area geografica di origine. Ad eccezione di pochi ceppi appartenenti allo stesso complesso clonale e con medesimo profilo fenotipico e genotipico di antibiotico-resistenza ed origine geografica per i quali si ipotizza essere lo stesso clone batterico, nella maggior parte dei casi non è stato possibile evidenziare correlazioni tra l'appartenenza ad un ST o CC e particolari profili fenotipici e genotipici di resistenza agli antimicrobici. L'elevata eterogeneità genotipica e fenotipica dei ceppi avvalorava quindi l'ipotesi secondo cui ad accelerare

notevolmente la diffusione di determinanti genici di antibiotico-resistenza sia il trasferimento orizzontale di materiale genetico tra i batteri piuttosto di una trasmissione esclusivamente verticale all'interno dello stesso clone.

La stretta associazione tra la presenza di integroni e la resistenza fenotipica a più molecole antimicrobiche è stata ampiamente documentata in letteratura. La ricerca di queste strutture in batteri sia gram-positivi che gram negativi multifarmaco-resistenti, e in particolare nelle *Enterobacteriaceae*, è stata condotta da moltissimi Autori in tutto il mondo. La presenza di queste strutture è stata riscontrata infatti sia in batteri commensali che patogeni, sia di origine umana, animale e ambientale (Bass *et al.*, 1999; Leverstein-vanHall *et al.*, 2003; Biyela *et al.*, 2004; Nijssen *et al.*, 2005; Skurnik *et al.*, 2005; Daikos *et al.*, 2007; Barlow *et al.*, 2009; Laroche *et al.*, 2009; Kristiansson *et al.*, 2011).

Nel nostro caso, il riscontro degli integroni con una prevalenza maggiore nel coniglio da carne può essere spiegata dal fatto che negli allevamenti intensivi la pressione selettiva esercitata dall'utilizzo degli antimicrobici favorisce la selezione di batteri antibiotico-resistenti. Inoltre, poiché questa tipologia di allevamento non prevede un periodo di vuoto sanitario tra un ciclo produttivo e il successivo, è probabile che batteri non necessariamente patogeni veicolanti queste strutture possano permanere nei capannoni e fungere da *reservoir* di geni di resistenza facilmente trasferibili ad altri microorganismi ivi presenti. La selezione di batteri antibiotico-resistenti legata all'utilizzo frequente di antimicrobici, insieme all'elevata densità degli animali per superficie, sono tutti fattori che favoriscono la comparsa e la diffusione di queste strutture e, con esse, del fenomeno dell'antibiotico-resistenza.

Nei conigli selvatici invece, la presenza di una percentuale importante di ceppi multifarmaco-resistenti e positivi agli integroni può essere spiegata dal fatto che il campionamento è stato eseguito su animali catturati nella pianura bergamasca, in una zona rurale ad elevata densità zootecnica. Poiché è stata dimostrata in letteratura la presenza di batteri

antibiotico-resistenti positivi a queste strutture anche nei reflui zootecnici, non si esclude che i conigli ne siano venuti a contatto (Stokes *et al.*, 2006; Guenther *et al.*, 2011; Guenther *et al.*, 2012).

Un discorso a parte deve essere invece fatto per i ceppi di *E. coli* isolati da lepri selvatiche. Questi sono infatti animali caturati ad altitudini elevate nelle zone montane della Provincia di Sondrio dove la zootecnia è di tipo estensivo. Considerando quindi l'oggetto del monitoraggio, completamente estraneo a qualsiasi tipo di trattamento farmacologico, il riscontro di ceppi con profili fenotipici e genotipici di multifarmaco-resistenza e con ST talvolta riscontrati anche in ceppi isolati in allevamento, è indicativo di una diffusione ormai globale di batteri antibiotico-resistenti e di come il fenomeno diffonda rapidamente anche in ambienti non sottoposti a pressione selettiva esercitata dai farmaci (Gionechetti *et al.*, 2002; Sayah *et al.*, 2005; Nebbia *et al.* 2008; Sjolund *et al.*, 2008; Literak *et al.*, 2009; Guenther *et al.*, 2011; Guenther *et al.*, 2012; Jardine *et al.*, 2012).

Da quanto discusso finora, la presenza degli integroni che veicolano geni responsabili della resistenza a diverse classi di antimicrobici è certamente un'informazione importante che permette di correlare la resistenza genotipica con quanto evidenziato dall'analisi dei profili fenotipici di resistenza agli aminoglicosidi, ai sulfamidici e al trimethoprim.

Tuttavia la presenza di queste strutture non è in grado di spiegare *in toto* le resistenze riscontrate nei confronti di tutte le classi di antimicrobici testate in questo studio. Infatti, come già accennato nel paragrafo precedente, una percentuale non trascurabile di ceppi di *E. coli* isolati sia da animali domestici che selvatici ha mostrato resistenza o una ridotta sensibilità nei confronti dei chinoloni, farmaci d'elezione nel trattamento delle infezioni in medicina umana per la loro attività ad ampio spettro.

Data l'importanza che queste molecole rivestono, lo studio è stato indirizzato alla ricerca dei geni *Plasmid Mediated Quinolone Resistance* (PMQR). Di recente infatti, sono stati scoperti geni a prevalente localiz-

zazione plasmidica, in grado di conferire ai batteri una bassa resistenza nei confronti dei chinoloni e una ridotta sensibilità ai fluorochinoloni.

La ricerca è stata condotta su tutti i ceppi di *E. coli* oggetto d'indagine indipendentemente dalla loro origine e dal profilo fenotipico di antibiotico-resistenza evidenziato. Su un totale di 172 ceppi testati (è stata riscontrata la positività di 21 ceppi (18 isolati da conigli commerciali, 2 da lepri e 1 da un coniglio selvatico; 12,2%) ai geni *oqxA* e *oqxB*, la maggior parte dei quali appartenenti al CC17, mentre nessuno è risultato portatore dei geni *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*) e *qepA*.

Da quando per la prima volta fu identificato in USA in un ceppo di *K. pneumoniae* il primo gene *qnr* in un plasmide (Martinez-Martinez, 1998), diversi ricercatori di tutto il mondo si sono dedicati alla ricerca, caratterizzazione e valutazione della trasferibilità dei geni *qnr* nelle *Enterobacteriaceae*, sia in ceppi commensali che patogeni soprattutto di origine umana. Tuttavia, negli ultimi anni, sono stati condotti diversi studi volti alla ricerca di questi geni anche in ceppi batterici di origine animale e ambientale (Jacoby *et al.*, 2006; Cavaco *et al.*, 2008; Cattoir *et al.*, 2008; Yue *et al.*, 2008; Cerquetti *et al.*, 2009; Dionisi *et al.*, 2009; Garcia-Fernandez *et al.*, 2009; Pallecchi *et al.*, 2010; Gibson *et al.*, 2010; Forcella *et al.*, 2010; Dolejska *et al.*, 2011; Hordijk *et al.*, 2011; Fortini *et al.*, 2011; Szmolka *et al.*, 2011; Mokracka *et al.*, 2012; Stephenson and Brown, 2012; Huang *et al.*, 2012; Marti and Balcazar, 2012; Hassan *et al.*, 2012; Schink *et al.*, 2012; ; Vien *et al.*, 2012; Cengiz *et al.*, 2012; Koo and Woo, 2012; Dolejska *et al.*, 2013).

Per quanto riguarda la presenza dei geni PMQR in ceppi di *E. coli* di origine animale, la maggior parte degli studi sono stati condotti in campioni provenienti da animali d'allevamento (in particolare suini e polli) e da compagnia (cavalli e cani) e, per quanto riguarda la prima categoria, sia sani che affetti da colibacillosi, raccolti in allevamento o al macello. La prevalenza di questi geni è risultata variabile a seconda dell'origine animale e geografica dei ceppi. Tuttavia, salvo per alcuni studi dove non è stata riscontrata la presenza di questi determinanti genetici stante la

resistenza fenotipica dei ceppi ai chinoloni (Lapierre *et al.*, 2008; Alesiani *et al.*, 2009), la maggior parte degli Autori ha rilevato la presenza sia dei geni *qnr*, soprattutto varianti alleliche delle famiglie *qnrB* e *qnrS*, sia il gene *aa(6')-Ib-cr*. Più raramente *qepA* (Yue *et al.*, 2008; Cerquetti *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Dolejska *et al.*, 2011; Szmolka *et al.*, 2011; Fortini *et al.*, 2011; Schink *et al.*, 2012).

Pochi Autori hanno invece riscontrato la presenza dei geni *oqxA* e *oqxB* e questo studio rappresenta la prima segnalazione di questi geni in ceppi di *E. coli* commensali e patogeni isolati da lagomorfi domestici e selvatici.

Ad eccezione dei due ceppi isolati da lepri, tutti gli *E. coli* risultati *oqxAB*-positivi in questo studio, hanno mostrato fenotipi di multifarmaco-resistenza e più del 70% (15/21 ceppi; 71%) a tutte le 5 classi di molecole testate e la presenza degli integroni di classe 1 nel proprio corredo genetico (16/21 ceppi; 76%). Inoltre, la maggior parte dei ceppi *oqxAB*-positivi isolati da conigli commerciali (18/21 ceppi; 85,7%) è risultata resistente all'acido nalidixico e alla flumechina e, di questi, 16/18 (88,9%) all'enrofloxacin e 12/18 (66,7%) intermedi o resistenti alla ciprofloxacina. Questo dato è indicativo del ruolo giocato da questi geni nella selezione di batteri con ridotta sensibilità a queste molecole, che successivamente possono acquisire resistenze clinicamente rilevanti a seguito di mutazioni a carico dei geni *gyrA*, *gyrB*, *parC* o *parE*. Tutti i campioni hanno inoltre mostrato resistenza o una sensibilità intermedia nei confronti delle tetracicline, della neomicina e streptomicina e la maggior parte ai sulfamidici e ai fenicoli. Inoltre, anche se i dati che seguono non sono stati inseriti tra i risultati, è stata testata la sensibilità fenotipica degli *E. coli* *oqxAB*-positivi anche ai β -lattamici, in particolare alle aminopenicilline (ampicillina e l'associazione dell'amoxicillina con l'acido clavulanico) e ad alcune cefalosporine di prima e seconda generazione (cefalotina, ceftiofur, cefotaxime e ceftazidime). Nonostante queste molecole siano raramente utilizzate per il trattamento delle infezioni batteriche negli allevamenti cunicoli intensivi e per questo escluse

dall'indagine, alcuni ceppi isolati da lagomorfi commerciali hanno mostrato resistenza o una sensibilità intermedia nei confronti dell'ampicillina (4/18; 22,2%), della cefalotina (3/18; 16,7%), dell'associazione amoxicillina e acido clavulanico, al ceftiofur e al cefotaxime (1/18; 5,6%).

Questi dati trovano corrispondenza con quanto riscontrato in letteratura. E' stato infatti dimostrato che i batteri che esprimono queste pompe di efflusso mostrano spesso resistenza anche alle cefalosporine per la presenza di β -lattamasi e ESBL e presentano concentrazioni minimi inhibenti (MIC) all'acido nalidixico, flumechina, enrofloxacin, ciprofloxacina e norfloxacin dalle 32 alle 64 volte superiori rispetto a coloro che ne sono privi. Oltre a conferire resistenza ai fluorochinoloni, queste pompe di efflusso promuovono inoltre l'estrusione dalla cellula batterica di numerosi altri composti non necessariamente correlati tra loro, come le tetracicline, il cloramfenicolo, il florfenicolo, il trimethoprim, l'ampicillina, l'olaquinox e alcuni disinfettanti e detergenti quali la clorexidina, l'SDS e l'etidio bromuro, concorrendo così alla diffusione di fenotipi di multifarmaco-resistenza nei ceppi in cui sono espresse (Hansen *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2013; Wong and Chen, 2013).

Il riscontro della presenza di queste pompe di efflusso sia a livello cromosomico che plasmidico, talvolta associate ad elementi trasponibili (IS26) e ai geni codificanti per le ESBL e di virulenza, è stato rilevato in diversi batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, in particolare in *K. pneumoniae*, *E. coli* e recentemente anche in alcuni ceppi di *Salmonella* spp. di origine umana, animale (soprattutto suini, polli e loro carni ma anche in specie minori quali anatre e oche, animali da compagnia e primati non umani) ed ambientale (acqua, suolo e reflui zootecnici). La prevalenza di questi geni è particolarmente variabile, dallo 0,4%-1,8% nei ceppi isolati in Sud-Corea, Svezia e Danimarca, fino al 51% di positività negli isolati in Cina (Hansen *et al.*, 2004; Hansen *et*

al., 2005; Hansen *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2013; Wong and Chen, 2013).

Per quanto riguarda la loro localizzazione, diversi Autori riportano la presenza dei geni *oqxAB* in plasmidi di dimensioni comprese tra le 43 kb e le 115 kb e appartenenti ai gruppi di incompatibilità IncF (FII e FIV) e IncX1 (pOLA52) (Hansen *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2007; Carattoli, 2009; Zhao *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2013).

Anche se in questo studio non è stata ancora completata la verifica della localizzazione a livello cromosomico e/o plasmidico di questi geni, la tipizzazione del contenuto plasmidico dei ceppi *oqxAB*-positivi ha permesso di evidenziare come tutti i ceppi esprimenti queste pompe di efflusso, ad eccezione del ceppo A6, fossero positivi ai plasmidi IncF. Non si esclude quindi la possibilità che questi geni trovino localizzazione a livello di questa famiglia di plasmidi come riportato in letteratura da più Autori (Zhao *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2013). Tuttavia, non sorprende il riscontro dei plasmidi IncF in un numero elevato di ceppi, anche commensali, come i due ceppi A21 e A25 isolati da lepri e PC139-31 da un coniglio selvatico (Tabella A.15). A differenza della maggior parte delle altre famiglie di plasmidi infatti, IncF è particolarmente diffuso nella flora intestinale umana e animale (soprattutto dei volatili) indipendentemente dalla pressione selettiva esercitata dalla presenza degli antimicrobici (Johnson *et al.*, 2007; Carattoli, 2009). Normalmente i plasmidi appartenenti a questa famiglia sono un gruppo particolarmente eterogeneo e presenti nella cellula batterica in un numero limitato di copie. Il più diffuso è repF (FII), da solo o in associazione a FIA, FIB e FIC. Oltre ad essere stato spesso associato alla diffusione dei geni codificanti per le ESBL, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA*, veicola anche geni di virulenza (Carattoli, 2009).

Particolarmente interessante è il ceppo A6. Come già accennato, è infatti l'unico ceppo *oqxAB*-positivo privo dei plasmidi IncF. Questo ceppo

appartiene al CC17 (ST119) e, diversamente dagli altri ceppi ad esso filogeneticamente correlati, è l'unico a veicolare un solo replicone, IncR, associato ai geni *qnr* (*qnrS1*) in *Salmonella* Montevideo e alle ESBL in *K. pneumoniae* (Garcia-Fernandez *et al.*, 2009).

Inoltre, dall'allineamento delle sequenze nucleotidiche di una porzione dei geni *oqxAB* dei 21 ceppi positivi, emerge come questo ceppo sia l'unico a presentare delle SNPs. Dal confronto delle sequenze nucleotidiche mediante BLAST dei geni *oqxA* e *oqxB* di questo campione con le sequenze presenti in *GenBank*, è emersa un'identità assoluta (100%) con i geni, a localizzazione cromosomica, di tre ceppi di *K. pneumoniae* di origine umana isolati in Taiwan, Corea e Cina (*sequence* ID: CP003785.1, CP002910.1 e AP006725.1).

Non si esclude quindi che i geni *oqxAB* del ceppo A6 possano trovare localizzazione nel plasmide IncR oppure a livello cromosomico.

Il confronto delle sequenze nucleotidiche parziali dei due geni degli altri 20 ceppi ha invece evidenziato un'identità del 100% con le sequenze dei geni *oqxA* e *oqxB* localizzati a livello plasmidico di 16 ceppi di *E. coli* e 3 di *K. pneumoniae*, di origine umana e animale, isolati prevalentemente in Cina. Primo tra tutti un campione isolato dal contenuto intestinale di un coniglio (*sequence* ID: JX442218.1).

Oltre ai plasmidi IncF, la maggior parte dei ceppi testati ha mostrato positività ad un minimo di 2 fino ad un massimo di 7 repliconi diversi, in particolare IncI1, IncN, IncHI1, IncP, IncX1, IncY e ColE. Anche IncI1 e IncN sono particolarmente diffusi tra le *Enterobacteriaceae*, in particolare nella flora batterica intestinale dei volatili oltre che umana, e poiché sono stati spesso associati alla diffusione di diversi geni codificanti per le ESBL, metallo- β -lattamasi VIM-1 e PMQR, si ritiene che gli animali fungano da serbatoio di questi geni (Carattoli, 2009; Carattoli, 2011; Fortini *et al.*, 2011).

Un dato particolarmente preoccupante è il riscontro soprattutto dei plasmidi IncP che, cointegrati con IncI1, sembrano veicolare gli integroni di classe 1 di almeno 2 dei ceppi di *E. coli* *intI1*-positivi testati in questo

studio. I plasmidi IncP sono una classe particolarmente versatile che spesso risulta cointegrata con altri repliconi. A differenza di IncF, IncH e IncI infatti, in grado di replicare limitatamente all'interno della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, i plasmidi IncP presentano uno spettro d'ospite particolarmente ampio (*Pseudomonas* spp. per esempio). La presenza del plasmide IncP cointegrato con IncI1 potrebbe quindi favorire lo scambio dei determinanti genici veicolati dagli integroni in uno spettro d'ospite più ampio, sia all'interno della famiglia delle *Enterobacteriaceae* sia in altri batteri gram-negativi (Toukdarian, 2004; Novais *et al.*, 2006; Carattoli, 2009; Suzuki *et al.*, 2010).

Come rilevato da altri Autori e riscontrato per i ceppi positivi agli integroni, la presenza dei geni *oqxAB* è stata rilevata in diversi cloni non necessariamente correlati filogeneticamente tra loro (Zhao *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2012). Nonostante la maggior parte dei ceppi *oqxAB*-positivi appartenga al CC17 (il più diffuso nella popolazione batterica considerata), non sono state evidenziate particolari correlazioni tra l'appartenenza ad un ST o ad un CC e la presenza dei geni *oqxAB* o di particolari classi plasmidiche, tali da poterli considerare peculiarità di singoli cloni e non conseguenza di una diffusione orizzontale di queste strutture tra ceppi diversi.

Studio B

***Profili fenotipici di antibiotico-resistenza e
ricerca di integroni in ceppi di E. coli isola-
ti da volatili commerciali e selvatici***

1B. Introduzione e scopo dello studio

L'allevamento avicolo intensivo, soprattutto del pollo e del tacchino, è uno dei più importanti settori zootecnici a livello mondiale. La carne avicola è infatti la più consumata al mondo dopo quella suina. Secondo la FAO-STAT, la produzione di carne avicola infatti si attesta intorno ai 98 milioni di tonnellate (dati riferiti al 2010) e ha subito un costante aumento negli ultimi anni grazie soprattutto allo sviluppo del settore in Paesi emergenti quali la Cina, il Brasile e l'India (FAO-STAT, 2012).

L'Italia rappresenta dopo la Francia (1 milione e 790 mila tonnellate), il Regno Unito (1 milione e 570 mila tonnellate), la Germania (1 milione e 380 mila) e la Polonia (1 milione e 258 mila), uno dei maggiori produttori in Europa, con 1 milione e 180 mila tonnellate di carne avicola prodotta nel 2010. In particolare, nel nostro Paese sono state prodotte circa 865.000 tonnellate di carne di pollo (pari al 73% della produzione di carne avicola totale) e 298.000 tonnellate (25%) di carne di tacchino. Nel nostro Paese infatti, l'allevamento avicolo industriale rappresenta il secondo settore zootecnico dopo quello suino (1 milione e 673 mila tonnellate di carne prodotte) e di poco superiore a quello bovino (1 milione e 63 mila tonnellate) (FAO-STAT, 2012).

Come già accennato, nell'allevamento avicolo intensivo l'uso di antimicrobici per la terapia e la prevenzione delle infezioni batteriche è una pratica particolarmente diffusa. L'obiettivo è contenere il più possibile le perdite economiche legate alle complicanze ad esse associate in termini di morbilità e mortalità (Lohren *et al.*, 2008; Guardabassi and Kruse, 2008).

La progressiva perdita di efficacia dei trattamenti farmacologici rappresenta quindi una minaccia non solo per le gravi perdite economiche in allevamento, ma soprattutto per la possibile diffusione di batteri antibiotico-resistenti e di determinanti genici di resistenza tra batteri dagli animali all'uomo mediante contatto diretto, come conseguenza di una

contaminazione ambientale oppure (e soprattutto) attraverso il consumo di derrate contaminate (WHO, 2011; EFSA and ECDC, 2012).

Come per lo studio A, anche in questo caso il monitoraggio del fenomeno dell'antibiotico-resistenza in batteri isolati da volatili selvatici è particolarmente interessante in quanto può fornire indicazioni sulla sua diffusione nell'ambiente indipendentemente dalla pressione selettiva esercitata dai farmaci.

Lo studio è stato quindi rivolto alla determinazione dei profili fenotipici e genotipici di antibiotico-resistenza dei ceppi di *E. coli* commensali e patogeni isolati sia da volatili d'allevamento che selvatici, con particolare riguardo alla ricerca e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e di classe 2. Queste strutture genetiche, spesso associate a plasmidi, sono tra le più coinvolte nella trasmissione orizzontale di *cluster* genici di antibiotico-resistenza tra batteri e quindi nella selezione e diffusione di microorganismi MDR.

2B. Materiali e Metodi

2B.1 Campioni oggetto d'indagine

L'indagine è stata svolta grazie alla collaborazione con la Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare del Dipartimento di Medicina Veterinaria e sanità pubblica dell'Università degli Studi di Milano, il laboratorio di Malattie Infettive del Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari dell'Università degli Studi di Perugia e con Veterinari che operano nel settore aviare nel Nord-Italia, i quali hanno forniti i ceppi di *E. coli* oggetto di questo studio.

I campioni presi in esame comprendevano:

- i) ceppi *Avian Pathogenic E. coli* (APEC), isolati a partire da visceri (cervello, polmoni, fegato, milza) ed essudati (liquido pericardico e articolare) di tacchini da carne con sintomatologia riconducibile a colisettemia;
- ii) ceppi APEC, isolati da visceri (cuore, sacco vitellino e polmoni) di broiler (*Gallus gallus*) di età compresa tra i 2 e i 30 giorni con sintomatologia riconducibile a colisettemia;
- iii) ceppi *Avian Fecal E. coli* (AFEC), isolati da tamponi cloacali di tacchini da carne apparentemente sani di uno degli allevamenti da cui sono stati isolati i ceppi APEC;
- iv) ceppi AFEC isolati da volatili selvatici (*Accipiter nisus*, *Anas platyrhynchos*, *Athene noctua*, *Apus apus*, *Buteo buteo*, *Corvus corone cornix*, *Corvus monedula*, *Falco subbuteo*, *Falco tinnunculus*, *Fringilla coelebs*, *Gallinago gallinago*, *Larus michahellis*, *Picus viridis*, *Streptopelia turtur*, *Strix aluco*, *Sylvia atricapilla*, *Turdus merula* e *Turdus philomelos*) reperiti grazie alla collaborazione con Veterinari liberi professionisti operanti nel settore, con associazioni venatorie e centri di recupero dell'avifauna selvatica del Nord-Italia (province di Milano, Bergamo e Padova).

L'indagine è stata condotta su un totale di 386 ceppi di *E. coli*, di cui 110 isolati da broiler, 188 da tacchini da carne (158 APEC e 30 AFEC) e 88 da volatili selvatici. La patogenicità dei ceppi APEC era stata verificata mediante ricerca di geni di virulenza (Giovanardi, *unpublished data*).

I ceppi batterici sono stati inviati al Laboratorio di Microbiologia e Malattie Infettive del Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione dell'Università degli Studi di Padova, dove sono state eseguite le successive analisi volte alla determinazione dei profili fenotipici di antibiotico-resistenza e la ricerca e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e 2.

2B.2 Determinazione dei profili fenotipici di antibiotico-resistenza

2B.2.1 Valutazione della sensibilità agli antimicrobici

I ceppi batterici sono stati rivitalizzati mediante semina su piastra di *Nutrient Agar* ed incubazione a 37°C per 20-24 ore. La valutazione della loro sensibilità alle molecole antimicrobiche è stata eseguita utilizzando il metodo di diffusione su piastra di Kirby-Bauer (1966), secondo la procedura raccomandata dal *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Sono state testate 20 molecole antimicrobiche appartenenti a 7 classi diverse:

vi) Aminoglicosidi

- Apramicina (APR) 15 µg (Elanco Lilly Animal Health)
- Kanamicina (K) 30 µg
- Gentamicina (CN) 10 µg
- Streptomicina (STR) 10 µg

vii) Chinoloni

- Acido Nalidixico (NA) 30 µg
- Ciprofloxacina (CIP) 5 µg
- Enrofloxacin (ENR) 5 µg (Bayer)
- Norfloxacina (NOR) 30 µg

viii) Tetracicline

- Doxibiclina (DO) 30 µg
- Tetraciclina (TET) 30 µg

ix) Sulfamidici potenziati (Diaminopirimidine)

- Trisulfamidico (S3) 300 µg
- Sulfametossazolo + Trimethoprim (SXT) 25 µg

x) Fenicoli

- Cloramfenicolo (CAF) 30 µg
- Florfenicolo (FFC) 30 µg

xi) Penicilline

- Ampicillina (AM) 10 µg
- Amoxiciclina + Acido clavulanico (AMC) 30 µg

xii) Cefalosporine

- Cefalotina (CF) 30 µg
- Ceftiofur (CFT) 30 µg
- Cefotaxime (CTX) 30 µg
- Ceftazidime (CAZ) µg.

L'inoculo di ciascun ceppo e l'allestimento degli antibiogrammi sono stati eseguiti come descritto nel paragrafo 2A.2.1 dello Studio A. I risultati sono stati interpretati secondo i criteri stabiliti per le *Enterobacteriaceae* dal CLSI (CLSI, 2002; CLSI, 2006; CLSI, 2007) e dalla *Société Française de Microbiologie* (SFM, 2011), ad eccezione delle molecole APR ed ENO la cui valutazione è stata eseguita secondo i *breakpoint* forniti dalla Ditta produttrice.

La qualità è stata verificata utilizzando *E. coli* ATCC 25922 come controllo.

2B.3 Ricerca e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e di classe 2

La ricerca e la caratterizzazione degli integroni di classe 1 e di classe 2 sono state eseguite come descritto nello Studio A nei capitoli 2.A.2 e 2A.3 e relativi paragrafi.

3B. Risultati

3B.1 Valutazione della sensibilità alle molecole antimicrobiche

3B.1.1 Profili di antibiotico-resistenza

Tutti i 386 ceppi di *E. coli* oggetto di questa indagine sono stati sottoposti alla valutazione della sensibilità a 20 molecole appartenenti a 7 classi di antimicrobici diverse.

Considerando i 298 ceppi isolati dai volatili domestici (polli e tacchini) le resistenze più elevate sono state riscontrate nei confronti delle tetracicline, sulfamidici, chinoloni di prima generazione e ad alcuni β -lattamici ed aminoglicosidi. Per quanto riguarda le tetracicline, il 92% dei ceppi è risultato resistente alla tetraciclina e l'82,9% alla doxiciclina. Livelli di resistenza simili sono stati riscontrati anche nei confronti dell'ampicillina (88,9%), del trisulfamidico (79,9%) e dell'acido nalidixico (75,8%). Anche se più contenute, sono state evidenziate percentuali di resistenza importanti anche nei confronti della streptomicina (71,5%), della cefalotina (52,3%), del cloramfenicolo (37,9%) e dell'enrofloxacin (29,8%). Inoltre, una percentuale elevata di ceppi (35,6%) è risultata intermedia a quest'ultima molecola (Tabella B.1).

Le sensibilità più elevate sono state invece riscontrate soprattutto nei confronti del florfenicolo (90,9%), della maggior parte degli aminoglicosidi (ad eccezione della streptomicina) dove percentuali di ceppi comprese tra il 46% e il 95,6% hanno mostrato sensibilità alla kanamicina, alla gentamicina e all'apramicina, alle cefalosporine ceftazidime (92,3%), cefotaxime (78,2%) e ceftiofur (62,1%) e alla combinazione dell'amoxicillina con l'acido clavulanico (56,4%). Per quanto riguarda i chinoloni, invece, i livelli più elevati di sensibilità sono stati evidenziati nei confronti delle molecole di seconda generazione norfloxacin (70,5%) e ciprofloxacin (61,7%) (Tabella B.1).

Prendendo in considerazione i ceppi separatamente in base alla specie animale da cui sono stati isolati (broiler *vs* tacchini) e alla loro patogenicità, le principali differenze tra i ceppi APEC riguardano le penicilline per le quali sono stati riscontrati livelli di resistenza più elevati nei ceppi isolati da tacchini rispetto ai broiler, mentre nei confronti del cloramfenicolo e dei chinoloni sono stati riscontrati livelli di resistenza pressoché raddoppiati nei ceppi APEC isolati da broiler rispetto ai tacchini, ad eccezione dell'acido nalidixico per il quale sono stati rilevati livelli di resistenza del tutto simili (~79%). Tuttavia, le differenze riscontrate per quanto riguarda l'enrofloxacin e la ciprofloxacin, si riducono notevolmente confrontando le percentuali di sensibilità a queste molecole. Diversi APEC isolati dai tacchini hanno infatti mostrato una sensibilità intermedia nei confronti di questi principi attivi (Tabella B.2).

Confrontando invece i ceppi di *E. coli* patogeni con i commensali (APEC *vs* AFEC) isolati dalla stessa specie animale (tacchino), livelli di resistenza sostanzialmente simili sono stati riscontrati nei confronti degli aminoglicosidi dove a prevalere è la sensibilità, fatta eccezione per la streptomycin e la kanamicin per le quali i ceppi AFEC sono sensibilmente più resistenti rispetto agli APEC. Un quadro del tutto simile si riscontra nei confronti del cloramfenicolo, delle penicilline e delle tetracicline: la quasi totalità degli AFEC infatti risulta resistente all'ampicillin, all'amoxicillin potenziata, alla tetraciclina e alla doxyciclina ed in percentuali più elevate rispetto ai ceppi APEC. Per quanto riguarda i chinoloni invece, i ceppi commensali sono risultati più sensibili rispetto ai patogeni, pur evidenziando livelli di resistenza non trascurabili, soprattutto nei confronti dell'acido nalidixico (46,7%) (Tabella B.2).

Per quanto riguarda gli 88 ceppi di *E. coli* isolati dai volatili selvatici, più del 50% dei ceppi ha mostrato sensibilità alla maggior parte delle molecole antimicrobiche testate. In particolare, la quasi totalità dei campioni è risultato sensibile agli aminoglicosidi apramicin (98,9%), gentamicin (96,6%) e kanamicin (78,4%). Lo stesso per i β -lattamici, soprattutto

nei confronti del ceftiofur (96,6%), ceftazidime (94,3%), cefotaxime (85,2%) e dell'associazione amoxicillina più acido clavulanico (94,3%). Livelli di resistenza particolarmente limitati (inferiori al 12%) sono stati riscontrati anche nei confronti dei chinoloni e fluorochinoloni di prima e seconda generazione e dei fenicoli, mentre le resistenze più elevate sono state rilevate nei confronti del trisulfamidico (55,7%), delle tetracicline (30-35%) e dell'ampicillina (30,7%). Non trascurabili anche le resistenze alla streptomicina (22,7%) e alla cefalotina (21,6%), per le quali il 30% dei ceppi è risultato intermedio (Tabella B.1).

Tabella B.1 Percentuali di ceppi di *E.coli* risultati sensibili (S), intermedi (I) e resistenti (R) alle molecole antimicrobiche testate, isolati da volatili domestici (broiler e tacchini) e selvatici.

Molecole antimicrobiche		Volatili domestici			Volatili selvatici		
		S	I	R	S	I	R
Aminoglicosidi	APR	95,6%	0,7%	3,7%	98,9%	0%	1,1%
	CN	77,9%	4,0%	18,1%	96,6%	1,1%	2,3%
	STR	12,5%	16,0%	71,5%	45,5%	31,8%	22,7%
	K	46,0%	36,2%	17,8%	78,4%	19,3%	2,3%
Cefalosporine	CF	18,2%	29,5%	52,3%	51,1%	27,3%	21,6%
	CTX	78,2%	12,1%	9,7%	85,2%	13,7%	1,1%
	CFT	62,1%	22,5%	15,4%	96,6%	2,3%	1,1%
	CAZ	92,3%	3,7%	4,0%	94,3%	2,3%	3,4%
Penicilline	AM	9,4%	1,7%	88,9%	60,2%	9,1%	30,7%
	AMC	56,4%	15,1%	28,5%	94,3%	3,4%	2,3%
Chinoloni	NA	22,5%	1,7%	75,8%	85,2%	3,4%	11,4%
	ENR	34,6%	35,6%	29,8%	83,0%	9,0%	8,0%
	CIP	61,7%	15,8%	22,5%	87,5%	5,7%	6,8%
	NOR	70,5%	6,0%	23,5%	91,0%	4,5%	4,5%
Sulfamidici	SXT	32,0%	0,7%	67,3%	89,8%	0%	10,2%
	S3	17,0%	3,0%	79,9%	36,4%	8,0%	55,7%
Tetracicline	TET	7,0%	1,0%	92,0%	45,5%	19,3%	35,2%
	DO	7,7%	9,4%	82,9%	58,0%	11,3%	30,7%
Fenicoli	CAF	58,1%	4,0%	37,9%	83,0%	8,0%	9,0%
	FFC	90,9%	7,4%	1,7%	94,3%	5,7%	0%

Legenda: APR=apramicina; CN=gentamicina; STR=streptomina; K=kanamicina; CF=cefalotina; CTX=cefotaxime; CFT=ceftiofur; CAZ=ceftazidime; AM=ampicillina; AMC=amoxicillina + acido clavulanico; NA=acido nalidixico; ENR=enrofloxacin; CIP=ciprofloxacina; NOR=norfloxacina; SXT=sulfametossazolo + trimetoprim; S3=trissulfamidico; TET=tetraciclina; DO=ossitettraciclina; CAF=cloramfenicolo; FFC=florfenicolo.

Tabella B.2 Percentuali di ceppi di *E.coli* AFEC e APEC risultati sensibili (S), intermedi (I) e resistenti (R) alle molecole antimicrobiche testate, isolati da tacchini e broiler.

Molecole antimicrobiche		Tacchini (ceppi AFEC)			Tacchini (ceppi APEC)			Broiler (ceppi APEC)		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R
Aminoglicosidi	APR	93,3%	0%	6,7%	96,2%	1,3%	2,5%	95,5%	0%	4,5%
	CN	80,0%	3,3%	16,7%	80,4%	1,3%	18,3%	73,6%	8,2%	18,2%
	STR	3,3%	10,0%	86,7%	12,7%	12,0%	75,3%	14,5%	22,7%	62,7%
	K	30,0%	0,3%	43,4%	50,6%	38,0%	11,4%	43,6%	20%	20%
Cefalosporine	CF	30,0%	26,7%	43,3%	15,2%	34,4%	49,4%	19,1%	21,8%	59,1%
	CTX	73,3%	6,7%	20,0%	87,3%	7,4%	5,1%	66,4%	20%	13,6%
	CFT	66,7%	3,3%	30,0%	65,2%	24,1%	10,8%	56,4%	25,5%	18,2%
	CAZ	96,7%	0,0%	3,3%	94,9%	1,9%	3,2%	87,3%	7,3%	5,5%
Penicilline	AM	0,0%	0,0%	100%	5,1%	1,3%	93,7%	18,2%	2,7%	79,1%
	AMC	6,7%	3,3%	90,0%	53,8%	16,5%	29,7%	73,6%	16,4%	10%
Chinoloni	NA	50,0%	3,3%	46,7%	19,0%	1,3%	79,7%	20%	1,8%	78,2%
	ENR	76,7%	16,7%	6,7%	33,5%	48,7%	17,8%	24,5%	21,8%	53,6%
	CIP	93,3%	3,3%	3,3%	62,7%	22,8%	14,5%	51,8%	9,1%	39,1%
	NOR	86,7%	3,3%	10,0%	79,1%	5,1%	15,8%	53,6%	8,2%	38,2%
Sulfamidici	SXT	36,4%	0%	63,6%	31,6%	3,2%	67,2%	36,4%	0%	63,6%
	S3	2,7%	0,9%	76,4%	14,6%	5,1%	80,4%	2,7%	0,9%	76,4%
Tetracicline	TET	0,0%	0,0%	100,0%	4,4%	1,9%	93,7%	12,7%	0%	87,3%
	DO	0,0%	3,3%	96,7%	5,1%	11,4%	83,5%	14,5%	10%	75,5%
Fenicoli	CAF	53,3%	6,7%	40,0%	68,4%	2,5%	29,1%	44,5%	4,5%	50,9%
	FFC	83,3%	16,7%	0,0%	91,1%	5,7%	3,2%	92,7%	7,3%	0%

Legenda: APR=apramicina; CN=gentamicina; STR=streptomicina; K=kanamicina; CF=cefalotina; CTX=cefotaxime; CFT=ceftiofur; CAZ= ceftazidime; AM=ampicillina; AMC=amoxicillina + acido clavulanico; NA=acido nalidixico; ENR=enrofloxacina; CIP=ciprofloxacina; NOR=norfloxacina; SXT=sulfametossazolo + trimethoprim; S3=trisulfamidico; TET=tetraciclina; OT=ossitettraciciclina; CAF=cloramfenicolo; FFC=florfenicolo.

3B.1.2 Profili di multifarmaco-resistenza

La maggior parte dei ceppi di *E.coli* isolati dai volatili domestici, indipendentemente dalla specie animale (broiler e tacchini), è risultata multifarmaco-resistente. Infatti, dei 298 ceppi testati, 274 (91,9%) ha mostrato resistenza a 3 o più classi di antimicrobici. In particolare, 180/188 (95,7%) isolati da tacchini (di cui 150 ceppi APEC e 30 AFEC) e 94/110 (85,4%) ceppi isolati da broiler hanno mostrato resistenza a 3 fino a 7 classi di molecole diverse.

Profili di multifarmaco-resistenza sono stati riscontrati anche in una percentuale elevata di ceppi di *E. coli* isolati da volatili selvatici. Su 88 campioni testati infatti, 32 (32/88; 36,4%) sono risultati resistenti a 3 fino a 6 classi di antimicrobici (Tabella B.3).

Tabella B.3 Profili di multifarmaco-resistenza (MDR) più diffusi nei ceppi di *E. coli* isolati da tacchini, broiler e volatili selvatici.

Specie Animale	Numero di classi antimicrobiche	Profilo di MDR	Numero di ceppi di <i>E. coli</i>
Tacchini	7	AmFenPenCefChSulTe	5 AFEC
	6	AmPenCefChSulTe	4 AFEC
	4	AmPenSulTe	9 AFEC
Tacchini	7	AmFenPenCefChSulTe	25 APEC
	6	AmPenCefChSulTe	24 APEC
	6	AmFenPenChSulTe	10 APEC
	5	AmPenChSulTe	29 APEC
	5	AmCefChSulTe	10 APEC
Broiler	7	AmFenPenCefChSulTe	35 APEC
	6	AmPenCefChSulTe	8 APEC
	6	AmFenPenChSulTe	7 APEC
	5	AmCefChSulTe	6 APEC
Volatili selvatici	6	AmFenPenChSulTe	3 AFEC
	5	AmPenCefSulTe	6 AFEC
	5	PenCefChSulTe	3 AFEC
	4	AmPenSulTe	3 AFEC
	3	CefSulTe	4 AFEC

Legenda: Am=aminoglicosidi; Fen=fenicoli; Pen=penicilline; Cef=cefalosporine; Ch=chinoloni; Sul=sulfamidici; Te=tetracicline.

Il *pattern* di resistenza riscontrato più frequentemente nei ceppi isolati dai volatili domestici è stata la combinazione delle classi AmFenPenCefChSulTe in 65/274 ceppi multifarmaco-resistenti (23,7%) mentre, negli uccelli selvatici, AmPenCefSulTe in 6/32 ceppi (18,7%).

Considerando separatamente gli *E. coli* a seconda della specie animale da cui sono stati isolati, i profili di resistenza più comuni nei ceppi AFEC isolati da tacchini sono stati AmPenSulTe (9/30; 30%), seguito da AmFenPenCefChSulTe (5/30; 16,7%) e AmPenCefChSulTe (4/30; 13,3%) mentre, per quanto riguarda i ceppi APEC isolati sempre dalla stessa specie animale, la combinazione più frequente è stata AmPenChSulTe in 29/180 ceppi multifarmaco-resistenti (16,1%), seguita da AmFenPenCefChSulTe e AmPenCefChSulTe in 25/180 (13,9%) e 24/180 (13,3%) ceppi e AmFenPenChSulTe e AmCefChSulTe ciascuna in 10/180 (5,5%) ceppi.

Il profilo fenotipico di multifarmaco-resistenza più frequente nei campioni isolati da polli prevedeva la resistenza a tutte e 7 le classi di antimicrobici testati. Infatti, 35/94 (37,2%) ceppi hanno mostrato la combinazione AmFenPenCefChSulTe, seguita da AmPenCefChSulTe (8/94; 8,5%), AmFenPenChSulTe (7/94; 7,4%) e AmCefChSulTe (6/94; 6,4%).

Infine, il *pattern* di resistenza più comune riscontrato nei 32 *E. coli* isolati da volatili selvatici, è stato AmPenCefSulTe in 6 ceppi (18,7%), isolati da un gheppio, una cornacchia, una civetta, un allocco, una taccola e una tortora. Le altre combinazioni più frequenti sono state CefSulTe (4/32; 12,5% isolati da cornacchie e da un tordo), e PenCefChSulTe, AmPenSulTe e AmFenPenChSulTe 3 ceppi ciascuna (9,4%). Quest'ultimo profilo è stato riscontrato in campioni di *E. coli* isolati da un merlo, da una cornacchia e da una civetta.

3B.2 Presenza e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e di classe 2

3B.2.1 *E. coli* isolati da volatili domestici

La ricerca e la successiva caratterizzazione molecolare degli integroni di classe 1 e di classe 2 è stata eseguita su 298 ceppi di *E. coli* isolati da polli e da tacchini da carne provenienti da allevamenti avicoli del Centro-Nord-Italia. Il 37,2% dei campioni (111/398 ceppi) è risultato positivo alla prima mentre il 7,4% (22/398 ceppi) alla seconda classe e, di questi, 9 ad entrambe le classi. Le dimensioni delle regioni variabili erano comprese tra poche centinaia di basi (500-600 pb) e 2000 pb e le cassette geniche riscontrate più di frequente sono state *aadA*, *sat*, *dfrA* e loro varianti, singole o in combinazione tra loro, codificanti rispettivamente per gli enzimi *dihydrofolate-reductase*, *aminoglycoside 3' adenylyltransferase* e *streptothricin acetyltransferase* responsabili della resistenza ad alcuni aminoglicosidi (streptomycin, spectinomycin e streptotricin) e al trimethoprim. Oltre a questi geni, sono state riscontrate, seppur in un numero limitato di ceppi, anche le cassette *orfF* ed *estX* codificanti per delle ipotetiche proteine la cui funzione tuttavia non è ancora conosciuta. E' inoltre importante ricordare che gli integroni di classe 1 in quanto tali, presentano nella propria regione conservata CS5' il gene *sul1*, codificante per l'enzima *dihydropteroate-synthase*, che conferisce resistenza ai sulfamidici.

3B.2.1.1 *E. coli* AFEC e APEC isolati da tacchini

Dei 188 *E. coli* isolati da tacchini da carne, 67 sono risultati positivi agli integroni di classe 1 (35,6%) e 16 agli integroni di classe 2 (8,5%) e, di questi, 5 portatori di entrambe le classi.

Per quanto riguarda i ceppi AFEC, 19/30 ceppi (63,3%) è risultato positivo agli integroni di classe 1 e 2 positivi agli integroni di classe 2 (6,7%).

Di questi, un ceppo è risultato portatore di entrambe le classi (Tabella B.3) .

Per quanto riguarda la caratterizzazione della regione variabile degli integroni di classe 1, l'amplificazione ed il successivo sequenziamento hanno evidenziato la presenza di frammenti di dimensioni comprese tra 600 pb e 2000 pb. Le cassette geniche riscontrate più di frequente sono state la combinazione dei geni *dfrA1-aadA1*, riscontrata in 11/19 ceppi (57,9%), responsabili della resistenza alla streptomicina e la spectinomicina e al trimethoprim. Oltre a questa combinazione, è stata rilevata anche la variante *dfrA12-aadA2* in 6/19 ceppi (31,6%), 5 dei quali presentavano, inserita tra le due cassette, il gene *orfF* codificante per un'ipotetica proteina la cui funzione è tuttavia ancora sconosciuta. Due ceppi presentavano invece cassette geniche singole, rispettivamente *dfrA7* e una porzione del gene *sat*, responsabile della resistenza alla spectinomicina. Per quanto riguarda invece i due ceppi positivi agli integroni di classe 2, entrambi presentavano nella propria regione variabile la combinazione dei geni *sat2-aadA1* di circa 1500 pb.

Tutti gli isolati veicolanti le succitate strutture geniche hanno mostrato un profilo fenotipico di multifarmaco-resistenza e i *pattern* riscontrati più frequentemente sono stati AmFenPenCefChSulTe e AmPenSulTe (5/19 ceppi ciascuno; 26,3%) (Tabella B.3). Considerando invece le singole molecole, tutti i ceppi positivi agli integroni sono risultati resistenti alla tetraciclina, ossitetraciclina, trisulfamidico, alla combinazione del sulfametossazolo con il trimethoprim e all'ampicillina e intermedi o resistenti alla streptomicina.

Per quanto riguarda invece i ceppi APEC, 48/158 ceppi (30,4%) è risultato positivo agli integroni di classe 1 e 14 positivi agli integroni di classe 2 (8,9%); di questi, 3 ceppi sono risultati positivi ad entrambi (Tabella B.4).

La caratterizzazione degli integroni di classe 1 ha permesso di evidenziare la presenza di regioni variabili di dimensioni comprese tra 1000 pb

e 1500 pb e la combinazione genica più frequente è stata *dfrA1-aadA1*, riscontrata in 25/48 ceppi (52%), responsabile della resistenza alla streptomicina, spectinomicina e al trimethoprim. Oltre a questa combinazione, in 2 ceppi (2/48; 4,2%) sono state rilevate rispettivamente le varianti *aadA2-dfrA12* e in 1 ceppo *estX-aadA*, dove il gene *estX* codifica per un'ipotetica esterasi o idrolasi la cui funzione non è ancora nota. I restanti 20 ceppi (41,7%) presentavano invece una cassetta genica singola, *aadA*, di cui 19 nella variante *aadA1* e 1 *aadA13*. Per quanto riguarda invece i 14 ceppi positivi agli integroni di classe 2, 8 (57,1%) presentavano nella propria regione variabile la combinazione dei geni *dfrA1-sat2-aadA1* di circa 2000 pb, 5 (35,7%) i geni *dfrA1-aadA1* e 1 ceppo *sat2-aadA1* di circa 1500 pb. Tutti gli isolati veicolanti le succitate strutture geniche hanno mostrato un profilo fenotipico di multifarmaco-resistenza e i *pattern* riscontrati nella maggior parte dei ceppi sono stati AmPenCefChSulTe in 23/59 ceppi (39%) e AmPenChSulTe in 22/59 (37,3%). Prendendo invece in considerazione le singole molecole antimicrobiche, tutti i ceppi sono risultati resistenti alla tetraciclina (100%), 58/59 (98,3%) all'ampicillina, 56/59 (94,9%) al trisulfamidico, e 53/59 (89,8%) alla combinazione del sulfametossazolo con il trimethoprim e all'acido nalidixico mentre 57/59 (96,6%) resistenti o intermedi alla doxiciclina e alla streptomicina.

Tabella B.3 (continua) Profili di multifarmaco-resistenza (MDR) dei ceppi di *E. coli* AFEC isolati tacchini (TA) positivi agli integroni e relativi geni-cassetta.

Specie animale	ID AFEC	Anno di isolamento	profilo MDR	<i>intI1</i>	<i>intI2</i>	Geni-cassetta veicolati dagli integroni 1	Geni-cassetta veicolati dagli integroni 2	Dimensione VR (pb)
TA	18042-1	2011	AmFenPenChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	18042-2	2011	AmFenPenCefSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	18042-3	2011	AmFenPenCefSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	18042-4	2011	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	17401-3	2011	FePenCefSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	17401-4	2011	AmPenSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	17401-5	2011	AmPenChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	16756-1	2011	AmFenPenSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	16756-2	2011	AmPenSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	16756-5	2011	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA12-orfF</i>	-	1500
TA	15446-2	2011	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA12-aadA2</i>	-	1500
TA	15446-4	2011	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	-	2000
TA	15446-5	2011	AmFenPenCefChSulTe	+	+	<i>sat</i>	<i>sat2-aadA1</i>	600; 1500
TA	16185-1	2011	AmPenSulTe	+	-	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	-	2000
TA	16185-2	2011	AmPenSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	16185-3	2011	AmPenSulTe	+	-	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	-	2000
TA	16185-4	2011	AmPenCefSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	16185-5	2011	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	-	2000
TA	14966-1	2011	AmFenPenChSulTe	-	+	-	<i>sat2-aadA1</i>	1500
TA	14966-2	2011	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA7</i>	-	800

Legenda: Am=aminoglicosidi; Fen=fenicoli; Pen=penicilline; Cef=cefalosporine; Ch=chinoloni; Sul=sulfamidici; Te=tetracicline; ID= numero identificativo.

Tabella B.4 (continua) Profili di multifarmaco-resistenza (MDR) dei ceppi di *E. coli* APEC isolati tacchini (TA) positivi agli integroni e relativi geni-cassetta.

Specie animale	ID APEC	Anno di isolamento	Profilo MDR	<i>intI1</i>	<i>intI2</i>	Geni-cassetta veicolati dagli integroni 1	Geni-cassetta veicolati dagli integroni 2	Dimensione VR (pb)
TA	27619-2	2009	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	28234-1p	2009	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	28234-1m	2009	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	410-1	2010	AmPenChSulTe	+	-	<i>estX-aadA1</i>	-	1800
TA	1038-1	2010	AmPenChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	2216-1	2010	AmPenSulTe	+	+	<i>aadA1</i>	<i>sat2-aadA1</i>	1000; 1500
TA	12685-1	2010	AmPenChSulTe	-	+	-	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
TA	12685-2	2010	AmPenChSulTe	-	+	-	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
TA	13282-1	2010	AmPenChSulTe	-	+	-	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
TA	14486-1 c	2010	AmPenChSulTe	-	+	-	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
TA	14486-2 c	2010	AmPenCefChSulTe	-	+	-	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
TA	15189-1	2010	AmPenChSulTe	-	+	-	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
TA	15189-2	2010	AmPenChSulTe	-	+	-	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
TA	15189-3	2010	AmPenChSulTe	-	+	-	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
TA	472-10	2009	FenPenChCefChsTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	105-08	2008	PenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	11828-09	2009	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	2861	2010	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	2999	2010	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	3349	2010	FenCefChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
TA	3642	2010	AmPenSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
TA	3733	2010	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>aadA2-dfrA12</i>	-	1500
TA	3765	2010	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	4335	2010	AmPenChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	4476	2010	AmPenChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500

Specie animale	ID APEC	Anno di isolamento	Profilo MDR	intI1	intI2	Geni-cassetta veicolati dagli integroni 1	Geni-cassetta veicolati dagli integroni 2	Dimensione VR (pb)
TA	T12824	2010	AmPenSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	T10445	2010	AmPenCef	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	T12796	2010	AmPenChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	T11371	2010	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
TA	T15324	2010	AmPenChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
TA	T15401	2010	AmCefSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
TA	T15177/1	2010	AmPenChSulTe	+	+	<i>aadA1</i>	<i>dfrA1-aadA1</i>	1000; 1500
TA	T15177/2	2010	AmPenChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
TA	T15290	2010	AmPenSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
TA	T15202	2010	PenCefChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
TA	21619	2010	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
TA	21808	2011	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	20738	2010	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
TA	22190	2010	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	21821	2010	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	T3217	2012	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	T4583	2012	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	T3964	2012	AmPenChSulTe	-	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
TA	T2460	2012	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	T5139	2012	AmPenChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	T4676	2012	AmPenChSulTe	-	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
TA	T4038	2012	AmPenChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
TA	T5168	2012	PenSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	T5012	2012	AmPenChSulTe	+	+	<i>aadA1</i>	<i>dfrA1-aadA1</i>	1000; 1500
TA	T3375	2012	AmPenSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
TA	T4561	2012	AmPenCefChTe	+	-	<i>aadA13</i>	-	1000
TA	T5262	2012	PenChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
TA	T4825	2012	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000

Specie animale	ID APEC	Anno di isolamento	Profilo MDR	<i>intI1</i>	<i>intI2</i>	Geni-cassetta veicolati dagli integroni 1	Geni-cassetta veicolati dagli integroni 2	Dimensione VR (pb)
TA	T3376	2012	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
TA	T5267	2012	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
TA	T4906	2012	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>aadA2-dfrA12</i>	-	1500
TA	T3093	2012	AmPenCefChSulTe	-	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
TA	T5584	2012	AmPenChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
TA	E338	2012	AmPenChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500

Legenda: Am=aminoglicosidi; Fen=fenicoli; Pen=penicilline; Cef=cefalosporine; Ch=chinoloni; Sul=sulfamidici; Te=tetracicline; ID=numero identificativo.

3B.2.1.2 *E. coli* APEC isolati da broiler

Su 110 ceppi analizzati, 44 (40%) sono risultati positivi agli integroni di classe 1 e 6 (5,4%) agli integroni di classe 2. Di questi, 4 sono risultati portatori di entrambe le classi (Tabella B.5).

Le regioni variabili presenti negli integroni di classe 1 avevano dimensioni comprese tra 600 pb e 1.500 pb e le combinazioni di cassette geniche più frequenti sono state *dfrA1-aadA1* (19/44 ceppi; 43,2%) e il singolo gene *aadA1* (14/44; 31,8%). Il gene *sat* o sue porzioni è stato riscontrato in 4/44 ceppi (9,1%) e, ciascuna in un solo ceppo, le combinazioni *dfrA17-aadA5*, *dfrA12-orfF-aadA2*, *aadA5*, *aadA2*, *dfrA7*, *estX-aadA1* e *sat2-aadA1*.

Le regioni variabili presenti negli integroni di classe 2 avevano dimensioni comprese tra 1.500 e 2.000 pb e la combinazione delle cassette geniche *dfrA1* e *aadA1* (5/6 ceppi; 83,3%) e *drfA1-sat2-aadA1* in 1 ceppo.

Tutti gli isolati positivi a queste strutture geniche hanno mostrato un *pattern* di multifarmaco-resistenza e 20 dei 46 ceppi (43,5%) ha mostrato resistenza a tutte e 7 le classi di antimicrobici testati (AmFenPenCefChSulTe) (Tabella B.5).

Considerando invece le singole molecole antimicrobiche, le resistenze maggiori sono state riscontrate nei confronti del trisulfamidico (44/46; 95,6%) della tetraciclina (42/46; 91,3%) e dell'associazione sulfametossazolo-trimethoprim e dell'acido nalidixico (41/46; 89,1%). Inoltre, la maggior parte dei ceppi è risultata intermedia o resistente alla streptomicina e ampicillina (44/46 ceppi; 95,6%) e alla cefalotina (42/46; 91,3%).

Tabella B.5 (continua) Profili di multifarmaco-resistenza (MDR) dei ceppi di *E. coli* APEC isolati da broiler (B) positivi agli integroni e relativi geni-cassetta.

Specie animale	ID APEC	Anno di isolamento	Profilo MDR	<i>intI1</i>	<i>intI2</i>	Geni-cassetta veicolati dagli integroni 1	Geni-cassetta veicolati dagli integroni 2	Dimensione VR (pb)
B	4152	2011	AmFenPenCefChSulTe	+	+	<i>aadA1</i>	<i>dfrA1-aadA1</i>	1000; 1500
B	4151	2011	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	4067	2011	AmFenPenCefChSul	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	4052	2011	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	3995	2011	AmFenPenCefChSulTe	+	+	<i>sat</i>	<i>aadA1-dfrA1</i>	600; 1500
B	3861	2011	AmFenPenChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
B	4427	2011	AmPenSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	3572	2010	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>aadA5-dfrA17</i>	-	1500
B	3394	2010	AmFenPenChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
B	5141	2010	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	5318	2010	-	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
B	5552	2010	AmPenChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
B	28710	2011	PenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	28782	2011	AmFenPenCefChSulTe	-	+	-	<i>aadA1-dfrA1</i>	1500
B	31392	2007	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	4390	2008	AmCefChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
B	P4359	2012	PenCefSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	T4883	2012	PenChSulTe	+	+	<i>dfrA1-aadA1</i>	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500;1500
B	P5626	2012	FenPenCefSulTe	+	-	<i>sat</i>	-	800
B	P4615	2012	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
B	P5635	2012	PenCefTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
B	P5083	2012	AmFenPenChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
B	P5094	2012	AmPenChSulTe	-	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
B	P3042	2012	AmPenCefChTe	+	-	<i>estX-aadA1</i>	-	1800
B	P5068	2012	AmFenPenChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000

Specie animale	ID APEC	Anno di isolamento	Profilo MDR	<i>intI1</i>	<i>intI2</i>	Geni-cassetta veicolati dagli integroni 1	Geni-cassetta veicolati dagli integroni 2	Dimensione VR (pb)
B	P2948	2012	CefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	5	2010	AmFenPenCefSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	9	2010	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>sat2-aadA1</i>	-	1500
B	12	2010	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	13	2010	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
B	14	2010	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	-	2000
B	17	2010	AmFenPenCefChSulTe	+	+	<i>dfr7</i>	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	1000; 2000
B	19	2010	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
B	20	2011	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>sat</i>	-	500
B	21	2011	FenPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	22	2011	AmPenCefChSulTe	+	-	<i>sat</i>	-	500
B	23	2011	AmFenPenCefChSulTe	+	+	<i>aadA1</i>	-	1000
B	24	2011	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	25	2011	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	28	2011	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>aadA5</i>	-	1000
B	30	2011	FenCefChTe	+	-	<i>aadA1</i>	-	1000
B	37	2012	PenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	42	2012	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	43	2012	AmFenPenCefChSulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
B	E349	2012	AmPenChSulTe	+	-	<i>aadA1-dfrA1</i>	-	1500
B	E350	2012	AmChSulTe	+	-	<i>aadA2</i>	-	1000

Legenda: Am=aminoglicosidi; Fen=fenicoli; Pen=penicilline; Cef=cefalosporine; Ch=chinoloni; Sul=sulfamidici; Te=tetracicline; ID=numero identificativo.

3B.2.2 *E. coli* AFEC isolati da volatili selvatici

Su un totale di 88 ceppi, 6 ceppi (6,8%), isolati rispettivamente da una cornacchia grigia (*Corvus corone cornix*), da un picchio verde (*Picus viridis*), da un germano reale (*Anas platyrhynchos*), da un lodolaio (*Falco subbuteo*) e da una civetta (*Athene noctua*), sono risultati positivi agli integroni di classe 1 mentre nessuno ceppo è risultato positivo agli integroni di classe 2 (Tabella B.6). Tutti i ceppi veicolanti queste strutture sono stati isolati da animali selvatici della Provincia di Padova ad eccezione della cornacchia grigia ricoverata presso il Centro di Recupero Animali Selvatici (C.R.A.S, WWF Oasi), Bosco di Vanzago (MI). La caratterizzazione della regione variabile di queste strutture ha permesso di evidenziare la presenza di frammenti di circa 1500 pb e le cassette geniche riscontrate sono state *dfrA* e *aadA* nelle varianti *dfrA1-aadA1* in 4/6 ceppi (66,7%) e *dfrA17-aadA5* nei rimanenti 2 ceppi (2/6; 33,3%) responsabili della resistenza alla streptomicina, spectinomicina e al trimethoprim. Due ceppi (2/6; 33,3%), isolati rispettivamente da una civetta e da una cornacchia, hanno mostrato un *pattern* fenotipico di multifarmaco-resistenza, rispettivamente AmFenPenChSulTe e PenCefChTe (Tabella B.6). Tutti e 6 i campioni sono risultati intermedi o resistenti alla streptomicina e al trisulfamidico mentre particolarmente interessanti sono soprattutto i profili fenotipici di antibiotico-resistenza dei due campioni isolati da una cornacchia e da una civetta rispettivamente nel 2010 e nel 2012. Questi ceppi di *E. coli* infatti hanno mostrato resistenza nei confronti della maggior parte delle molecole testate, in particolare ai β -lattamici (cefalotina e cefotaxime, intermedio al ceftiofur e al ceftazidime), a tutti i chinoloni testati (sia di prima che di seconda generazione) e alle tetracicline per quanto riguarda il primo (ID 54) mentre il secondo (ID 206-3) alla streptomicina, al cloramfenicolo, all'ampicillina, ai chinoloni (acido nalidixico e all'enrofloxacin e intermedio alla ciprofloxacin), ai sulfamidici (anche potenziati) e alle tetracicline.

Tabella B.6 Profili di multifarmaco-resistenza (MDR) dei ceppi di *E. coli* AFEC isolati da volatili selvatici positivi agli integroni e relativi geni-cassetta.

Specie animale	ID AFEC	Anno di isolamento	profilo MDR	<i>intI1</i>	<i>intI2</i>	Geni-cassetta veicolati dagli integroni 1	Geni-cassetta veicolati dagli integroni 2	Dimensione VR (pb)
Cornacchia	54	2010	PenCefChTe	+	-	<i>dfrA17-aadA5</i>	-	1500
Picchio verde	165-2	2011	CefSul	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
Picchio Verde	165-2	2011	SulTe	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
Germano reale	168-2	2011	Sul	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
Lodolaio	172-2	2011	-	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	-	1500
Civetta	206-3	2012	AmFenPenChSulTe	+	-	<i>dfrA17-aadA5</i>	-	1500

Legenda: Am=aminoglicosidi; Fen=fenicoli; Pen=penicilline; Cef=cefalosporine; Ch=chinoloni; Sul=sulfamidici; Te=tetracicline; ID=numero identificativo.

4B. Discussione

4B.1 Profili fenotipici e genotipici di antibiotico-resistenza

La valutazione della sensibilità alle molecole antimicrobiche è stata condotta in ceppi di *E. coli* sia patogeni che commensali (APEC e AFEC) isolati da volatili domestici (polli e tacchini) e selvatici.

La scelta delle molecole è stata eseguita in modo tale che fossero rappresentate le principali classi di antimicrobici più utilizzate nella terapia delle infezioni in medicina umana, nel trattamento della colibacillosi nell'allevamento avicolo intensivo e il cloramfenicolo.

Rispetto allo studio A sono state inoltre aggiunte le molecole antimicrobiche appartenenti alle classi delle penicilline e delle cefalosporine.

L'analisi ha evidenziato come una percentuale superiore al 90% degli *E. coli* isolati dagli allevamenti avicoli intensivi mostrasse un profilo di multifarmaco-resistenza, intesa come la resistenza ad almeno 3 delle 7 classi di antimicrobici testate, in particolare i ceppi isolati dai tacchini da carne. Profili di multifarmaco-resistenza sono stati evidenziati anche in più di un terzo dei ceppi isolati dai volatili selvatici, i quali hanno mostrato resistenza ad un minimo di 3 fino ad un massimo di 6 classi antimicrobiche sottoposte ad analisi.

Per quanto riguarda broiler e tacchini, livelli di resistenza particolarmente elevati sono stati rilevati soprattutto nei confronti delle principali classi di molecole utilizzate, oggi o in passato, negli allevamenti avicoli intensivi per il trattamento e la prevenzione delle principali forme batteriche e parassitarie che colpiscono gli animali durante il ciclo produttivo e in particolare della colibacillosi aviare (sulfamidici potenziati, penicilline, alcuni aminoglicosidi e fluorochinoloni).

Oltre alle corrette prassi igienico-sanitarie volte a ridurre i fattori predisponenti, il controllo della colibacillosi negli allevamenti avicoli intensivi

avviene normalmente mediante il trattamento degli animali con antimicrobici e chemioterapici (Gyles *et al.*, 2008b).

Più del 60% dei ceppi di *E. coli* isolati dalle carcasse di broiler e tacchini da carne e deceduti per colibacilloso ha mostrato resistenza soprattutto nei confronti delle tetracicline, sulfamidici, trimethoprim, ampicillina, streptomicina e acido nalidixico. Resistenze non trascurabili sono state evidenziate anche alla cefalotina, enrofloxacin e al suo analogo ciprofloxacin ad uso esclusivamente umano.

La resistenza alle tetracicline è stata ormai ampiamente documentata ed è legata al largo utilizzo, soprattutto in passato, per il trattamento delle infezioni e come auxinico nell'allevamento avicolo. Fin dalla loro introduzione infatti, che risale agli anni '50, è stata riscontrata una progressiva e rapida perdita di efficacia di queste molecole legata allo sviluppo di resistenze nei batteri. Per questo motivo il loro utilizzo è ormai sconsigliato per il trattamento delle infezioni sostenute da batteri gram-negativi (Sojca e Carnaghan, 1962; Wilkenson *et al.*, 2004; Gyles *et al.*, 2008b).

Come riportato da diversi Autori, oltre alle tetracicline anche la resistenza spesso combinata ai sulfamidici (anche potenziati), alle penicilline e alla streptomicina è particolarmente diffusa nei ceppi APEC e, per la maggior parte di queste molecole, è riconducibile al loro utilizzo in allevamento. Infatti, l'associazione del sulfametossazolo con il trimethoprim, l'amoxicillina e la penicillina sono i principi attivi di prima e seconda scelta per il trattamento delle infezioni sostenute da *E. coli* in avicoltura (Vandemaele *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Miles *et al.*, 2006; White, 2006; Guardabassi and Kruse, 2008).

A destare certamente preoccupazione è la resistenza riscontrata nei confronti dei chinoloni, in particolare dell'enrofloxacin, per la quale soltanto il 34,6% dei ceppi ha mostrato sensibilità.

Soltanto di recente i fluorochinoloni sono stati autorizzati per la terapia della colibacilloso aviario e da subito hanno mostrato la loro efficacia nel

trattamento anche delle forme più gravi di questa patologia (Glisson *et al.*, 2004). Tuttavia, a causa della progressiva diffusione di resistenza alle succitate molecole in diversi ceppi di *E. coli*, lo sviluppo di resistenze crociate all'interno della stessa classe e l'importanza che esse rivestono nel trattamento delle infezioni in medicina umana, il loro utilizzo è stato vietato nell'industria avicola statunitense e di diversi Paesi nel mondo (Bazile-Pham-Khal *et al.*, 1996; Giraud *et al.*, 2001; White, 2006).

In Europa il loro impiego è consentito in condizioni controllate come molecole di terza scelta per la terapia delle forme sistemiche di colibacillosi oppure nel caso siano sostenute da batteri resistenti alle molecole di prima e seconda scelta (Gyles *et al.*, 2008b).

Una percentuale importante di ceppi ha mostrato resistenza anche nei confronti del cloramfenicolo, nonostante in Europa il suo utilizzo sia stato bandito più di 15 anni fa.

Le sensibilità più elevate sono state invece riscontrate nei confronti della maggior parte degli aminoglicosidi, cefalosporine e dei fluorochinoloni ciprofloxacina e norfloxacina. Gli aminoglicosidi sono infatti molecole il cui utilizzo è pratica comune quasi esclusivamente in incubatoio per evitare la trasmissione verticale di ceppi APEC dai riproduttori alla prole mentre le cefalosporine sono molecole poco utilizzate nell'allevamento avicolo intensivo (Salmon and Watts, 2000). Questione a parte per la ciprofloxacina, molecola ad uso esclusivamente umano. Tuttavia, data l'importanza che i β -lattamici e i fluorochinoloni rivestono nel trattamento delle infezioni in medicina umana, non deve essere sottovalutato il riscontro di una percentuale importante di ceppi resistenti alla penicillina, alla combinazione dell'amoxicillina con l'acido clavulanico, alla cefalotina, alla ciprofloxacina e norfloxacina.

Ad eccezione delle penicilline, nei confronti delle quali una percentuale più elevata di ceppi APEC isolati da tacchini da carne ha mostrato resistenza rispetto a quelli isolati da broiler, non sono state riscontrate differenze salienti confrontando i risultati sulla base della specie animale

campionata e, in ogni caso, possono essere riconducibili ai diversi trattamenti, anche in termini di durata, a cui sono stati sottoposti gli animali. Il ciclo produttivo dei tacchini è notoriamente più lungo rispetto ai broiler e di conseguenza più elevata è la probabilità che si rendano necessari trattamenti farmacologici e, con essi, la progressiva comparsa di ceppi antibiotico-resistenti. E' inoltre importante sottolineare che mentre la maggior parte dei tacchini da carne provenivano da cicli produttivi diversi dello stesso allevamento oppure da allevamenti diversi ma della stessa azienda integrata, i ceppi isolati da broiler sono invece il risultato di campionamenti eseguiti su animali appartenenti a varie filiere, anche geograficamente distanti. Se ne deduce quindi che le percentuali di resistenza calcolate per gli *E. coli* isolati da broiler, diversamente da quelli isolati dai tacchini, possano risentire delle abitudini, non necessariamente simili, delle aziende nella scelta dei trattamenti farmacologici.

Per quanto riguarda i ceppi commensali (AFEC), essi sono stati isolati tutti da tacchini da carne maschi del primo dei 3 cicli produttivi di uno stesso allevamento campionati in provincia di Verona dove erano presenti animali con sintomatologia riconducibile a colibacilloso e dai quali è stato possibile isolare 48 dei 158 ceppi APEC analizzati in questo studio. I prelievi sugli animali apparentemente sani sono stati eseguiti intorno alla terza settimana di vita.

Confrontando le percentuali di resistenza riscontrate nei ceppi AFEC rispetto agli APEC isolati dalla stessa specie animale, ad emergere sono livelli più elevati nei ceppi commensali rispetto ai patogeni, soprattutto nei confronti delle penicilline, in particolare dell'associazione dell'amoxicillina e dell'acido clavulanico, delle tetracicline e del cloramfenicolo. Al contrario, i ceppi APEC hanno mostrato resistenze sensibilmente più elevate nei confronti dei chinoloni.

La presenza di livelli elevati di resistenza sia nei ceppi APEC che AFEC non sorprende. Numerosi sono infatti gli studi relativi alla diffusione del fenomeno negli avicoli e la maggior parte mostra, pur con differenze a

seconda dell'area geografica considerata, la presenza di ceppi sia APEC che AFEC antibiotico-resistenti e talvolta, in accordo con quanto emerso in questo studio, le resistenze dei ceppi commensali sono più elevate rispetto a quelle riscontrate nei patogeni, soprattutto alle penicilline (Salmon e Watts, 2000; Cormican *et al.*, 2001; Altekruuse *et al.*, 2002).

Inoltre, i dati raccolti in questo studio, fotografano un *trend* delle resistenze in aumento per la maggior parte delle molecole rispetto a quanto riportato nei recenti *report* dell'EFSA sulla diffusione in Italia del fenomeno dell'antibiotico-resistenza in *E. coli* isolati negli allevamenti di pol-lame (periodo 2004-2007) (EFSA, 2010a).

L'elevata resistenza riscontrata nei ceppi AFEC è riconducibile al fatto che, essendo batteri commensali della normale microflora intestinale, sono sottoposti alla pressione selettiva esercitata dai trattamenti farmacologici eseguiti sugli animali molto più dei ceppi patogeni. Il loro rilievo tuttavia, per quanto comprensibile, desta preoccupazione. Infatti, pur non svolgendo un ruolo di primo piano dato che solo raramente sono responsabili di patologie, questi batteri possono fungere da *reservoir* di geni di resistenza alle molecole antimicrobiche nell'intestino animale così come nella lettiera, e trasmetterli orizzontalmente anche a microorganismi patogeni (EFSA, 2008b).

Come già ampiamente discusso nello studio A, la resistenza agli antimicrobici è determinata geneticamente ed è facilmente trasferibile all'interno di una specie o tra batteri diversi attraverso elementi mobili di DNA e l'intestino dei polli sembra essere un ambiente favorevole affinché questo si verifichi (Bass *et al.*, 1999; Lanz *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004; Hart *et al.*, 2006).

Lo studio è stato quindi rivolto alla ricerca e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e di classe 2 con l'obiettivo di verificare la diffusione di queste strutture nella popolazione batterica oggetto di indagine.

La presenza degli integroni di classe 1 e di classe 2 è stata riscontrata in ceppi di *E. coli* sia AFEC che APEC isolati da tutte le specie di animali

commerciali considerate. Gli integroni di classe 1 sono stati riscontrati con una prevalenza maggiore negli AFEC isolati da tacchini da carne (63,3%) e presentavano dimensioni variabili comprese tra 600 pb e 1500 pb, mentre gli integroni di classe 2 negli APEC isolati dalla stessa specie animale (8,9%; 1500-2000 pb) e, tra tutti i ceppi risultati positivi a queste strutture, 9 ad entrambe le classi. La presenza di integroni di classe 2 in una percentuale limitata di ceppi è in accordo con quanto già riferito in letteratura, secondo cui queste strutture si riscontrano meno frequentemente rispetto agli integroni di classe 1 e solo pochi Autori riportano di ceppi positivi ad entrambe le classi (Radstrom *et al.*, 1994; Collis and Hall, 1995; Ploy *et al.*, 2000b; Fluit and Schmitz, 2004; Vinuè *et al.*, 2008; Stephenson and Brown, 2012).

Per quanto riguarda gli integroni di classe 1 presenti nel corredo genetico dei ceppi AFEC isolati dai tacchini da carne, le cassette geniche riscontrate con frequenza maggiore sono state le combinazioni dei geni *aadA* e *dfrA* (nelle varianti alleliche *dfrA1-aadA1* e *dfrA12-aadA2*), seguite da *dfrA12-orfF-aadA2* e singolarmente i geni *dfrA7* e *sat*. Questi geni, ad eccezione di *orfF* la cui funzione non è ancora nota, codificano per enzimi responsabili della resistenza alla streptomicina, spectinomina, streptotricina e al trimethoprim.

Gli integroni di classe 2 invece, hanno tutti presentato la combinazione genica tra le più frequentemente riscontrate in letteratura in queste strutture, ossia *sat2-aadA1*.

Analogamente ai ceppi AFEC, la maggior parte degli integroni di classe 1 presenti nei ceppi di *E. coli* APEC isolati da tacchini e broiler hanno presentato la combinazione genica *dfrA-aadA* nelle varianti *dfrA1-aadA1*, *aadA5-dfrA17* e *aadA2-dfrA12*, seguita dalla cassetta genica *aadA* (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5* e *aadA13*). Cinque ceppi isolati da broiler hanno invece presentato nella regione variabile dell'integrone il gene *sat* da solo o in combinazione con *aadA1*. Meno frequenti, la combinazione *estX-aadA1* e *dfrA12-orfF-aadA2*, riscontrate tuttavia anche in uno stu-

dio recente condotto in Nigeria in ceppi di *E. coli* patogeni di origine umana e animale (Chah *et al.*, 2010)

Per quanto riguarda gli integroni di classe 2, le cassette geniche riscontrate sono state varie combinazioni dei geni *dfrA1*, *sat2* e *aadA1*.

Come già discusso nello studio A, la presenza di un numero limitato di cassette geniche è in accordo con quanto riportato nella maggior parte degli articoli presenti in letteratura. Infatti, nonostante ad oggi siano state descritte in queste strutture moltissime cassette in grado di conferire resistenza a quasi tutte le classi di antimicrobici, i geni che si riscontrano più frequentemente negli integroni di classe 1 e 2 sono *dfrA* e *aadA* e *sat*, soprattutto per quanto concerne gli integroni di classe 2. Il numero e la tipologia delle cassette geniche riscontrate in queste strutture infatti è particolarmente limitata a causa di una ridotta capacità dell'integrasi di promuovere la loro inserzione nel sito di ricombinazione (Biskri and Mazel, 2003; Fluit and Schmitz, 2004; Ramirez *et al.*, 2005; Mazel, 2006; Kim *et al.*, 2007; Van Essen-Zandbergen *et al.*, 2007; Lapierre *et al.*, 2008; Vasilakopoulou *et al.*, 2009; Chah *et al.*, 2010; Barraud *et al.*, 2010; Ponce-Rivas *et al.*, 2012).

Un dato interessante è la presenza della cassetta genica *estX* nella regione variabile degli integroni di classe 1, in combinazione con *aadA1*. A differenza di quest'ultimo gene, notoriamente presente negli integroni di entrambe le classi, *estX* è stato spesso correlato agli integroni di classe 2 e solo raramente a quelli di classe 1. Questo gene, come accennato nello studio A, codifica per un'ipotetica esterasi o idrolasi la cui funzione non è ancora conosciuta. Tuttavia, dalla letteratura sembra esista una somiglianza con il gene *sat* responsabile della resistenza alla streptotricina (Partridge, 2005).

La presenza di queste strutture è stata riscontrata in ceppi di *E. coli* con profili fenotipici di multifarmaco-resistenza, ad eccezione di un ceppo APEC isolato da un pollo che invece non ha mostrato resistenza a nessuna delle molecole testate. Inoltre, considerando le singole molecole

antimicrobiche, una percentuale superiore al 90% dei campioni *int1* e/o *int2*-positivi hanno mostrato resistenza o una sensibilità intermedia nei confronti dell'ampicillina, delle tetracicline, dei sulfamidici anche potenziati con il trimethoprim, della streptomina e, i ceppi APEC isolati da entrambe le specie, anche nei confronti dell'acido nalidixico.

Il rilievo della presenza di queste strutture in un numero elevato di ceppi APEC e AFEC è in accordo con quanto riscontrato in letteratura. Diversi Autori infatti riportano la presenza di queste strutture, in percentuali variabili a seconda dell'origine anche geografica, sia in ceppi commensali che patogeni isolati sia in allevamento che da prodotti carnei di origine avicola, campionati al macello o nei punti vendita (Bass *et al.*, 1999; Lanz *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004; Sunde, 2005; Sunde and Norstrom, 2006; Kim *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2008; Khaita *et al.*, 2008; Trobos *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2009; Jouini *et al.*, 2009; Soufi *et al.*, 2009; Alessiani *et al.*, 2009; Altalhi *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011).

In accordo con quanto documentato in letteratura, un'analisi più dettagliata dei profili fenotipici e genotipici dei ceppi ha permesso di evidenziare la presenza di più cloni batterici antibiotico-resistenti, sia APEC che AFEC, contemporaneamente nello stesso animale (Lutful Kabir, 2010). Questo fenomeno è riconducibile alla possibilità che altri animali, soprattutto gli uccelli selvatici e i roditori, possano fungere da vettori meccanici di ceppi APEC in allevamento. Inoltre, qualora non vengano rispettate le corrette prassi igieniche soprattutto tra un ciclo produttivo e l'altro, è possibile che i microorganismi permangano nel capannone, soprattutto nella lettiera, e possano infettare gli animali del ciclo successivo (Barnes *et al.*, 2008; Lutful Kabir, 2010).

A parte i casi in cui ceppi isolati dallo stesso animale hanno mostrato medesimi profili fenotipici e genotipici (seppur parziali) di antibiotico-resistenza, soprattutto nei tacchini è stato possibile riscontrare la presenza di più cloni batterici nella stessa sede di prelievo (ID-1; ID-2 etc.)

oppure da organi e/o essudati diversi. In molti casi batteri isolati dallo stesso animale hanno mostrato un profilo di antibiotico-resistenza diverso. Degni di nota sono per esempio gli AFEC TA 17401, TA 16756, TA 15446, TA 16185 e TA 14966 e il ceppo APEC TA 14486 (Tabelle B.3 e B.4). Molti di questi ceppi (distinguibili sulla base del proprio ID numerato progressivamente -1; -2; -3 etc.), pur essendo isolati dallo stesso animale, hanno presentato profili fenotipici diversi ma le stesse cassette geniche nella regione variabile dell'integrone che veicolano e, viceversa, resistenze del tutto simili fenotipicamente ma differenze a livello genotipico. Anche se questi riscontri necessitano certamente di ulteriori approfondimenti, possono essere indicativi della presenza di più ceppi contemporaneamente nello stesso animale veicolanti lo stesso integrone oppure di ceppi clonali che invece hanno acquisito da altri batteri integroni diversi.

Analogamente a quanto riscontrato nello studio A, la presenza di cassette geniche incomplete, soprattutto il gene *sat*, può essere ricondotta ad un errore durante la loro acquisizione o escissione. Ciò supporterebbe la mancata corrispondenza tra profilo fenotipico e genotipico di antibiotico-resistenza riscontrata in alcuni casi. Viceversa, alcuni ceppi veicolanti i geni *dfrA* e *aadA* completi, non hanno mostrato fenotipicamente resistenza agli aminoglicosidi e/o all'associazione del sulfametossazolo con il trimethoprim. La discordanza rilevata può essere dovuta a mutazioni nucleotidiche all'interno della sequenza codificante dei geni oppure a carico del promotore tali da impedirne l'espressione. Parallelemente, il riscontro di ceppi con fenotipi di resistenza a queste molecole ma privi di integroni, oppure ad antimicrobici i cui determinanti genetici non sono veicolati da queste strutture, è indicativo dell'intervento di altri elementi o meccanismi genetici capaci di rendere gli antimicrobici inefficaci nei batteri che li veicolano ed esprimono.

Alla luce dell'eterogeneità di plasmidi coniugativi responsabili della diffusione di geni di antibiotico-resistenza e di virulenza nei ceppi di *E. coli*

isolati dai lagomorfi sia domestici che selvatici riscontrati nello studio A, non si esclude la possibilità che anche questi campioni veicolino tali strutture e che gli integroni possano trovare ivi la loro localizzazione. Studi recenti hanno infatti dimostrato come molto spesso gli integroni, veicolanti geni di resistenza a diversi antimicrobici tra cui le cefalosporine (ESBL) si trovino in plasmidi appartenenti a diversi *inc-group* (Carrattoli, 2009).

Considerazione a parte deve essere fatta per i ceppi di *E. coli* isolati dai volatili selvatici. Anche se in una percentuale di ceppi certamente più contenuta (30-50%), gli isolati da questi animali hanno mostrato resistenza oppure una sensibilità intermedia a diverse molecole antimicrobiche, in particolare nei confronti dei sulfamidici, delle tetracicline, dell'ampicillina, streptomina e cefalotina.

Inoltre, seppur in una percentuale ridotta di ceppi, è stata riscontrata positività agli integroni di classe 1 anche in questi animali. Sono infatti risultati positivi a queste strutture 6 ceppi isolati rispettivamente da un picchio verde (2 ceppi), un germano reale, un lodolaio, una cornacchia e una civetta.

Come già discusso nello studio A, le differenze riscontrate tra gli *E. coli* isolati dagli animali domestici rispetto ai selvatici in termini di sensibilità alle molecole antimicrobiche e di positività agli integroni sono riconducibili al diverso contesto ambientale in cui si trovano a vivere i volatili commerciali rispetto agli animali a vita libera. Tuttavia, il riscontro di questi determinanti genetici con probabile localizzazione plasmidica e di resistenze fenotipiche comunque importanti nei confronti di diverse classi di antimicrobici in animali selvatici mai sottoposti a trattamenti farmacologici, è indicativa di quanto il fenomeno dell'antibiotico-resistenza sia diffuso e facilmente si diffonda anche in microorganismi di diverse nicchie ecologiche non necessariamente esposti ad una pressione selettiva esercitata dai farmaci (Gionechetti *et al.*, 2002; Sayah *et*

al., 2005; Nebbia *et al.* 2008; Literak *et al.*, 2010; Sjolund *et al.*, 2008; Guenther *et al.*, 2011; Guenther *et al.*, 2012; Jardine *et al.*, 2012).

Nel nostro caso, la maggior parte degli animali selvatici campionati provenivano da zone peri-urbane o collinari della Provincia di Padova dove la zootecnia e il livello di urbanizzazione sono certamente elevati. Come già discusso per i conigli selvatici, non si esclude quindi che gli animali possano essere venuti a contatto con batteri antibiotico-resistenti a seguito di una contaminazione del suolo e delle acque con liquami (Stokes *et al.*, 2006; Guenther *et al.*, 2011; Guenther *et al.*, 2012). Tuttavia, essendo la maggior parte di questi volatili dei predatori (civetta, cornacchia e lodolaio) o comunque animali che si cibano anche di piccoli animali, lombrichi ed insetti (picchio verde e germano reale), non si esclude possano aver acquisito determinanti genetici di antibiotico-resistenza mediante la via alimentare.

Conclusioni

L'antibiotico-resistenza rappresenta certamente uno dei principali problemi di sanità pubblica a livello mondiale e negli ultimi anni ha assunto proporzioni tali da spingere l'Unione Europea a considerarla alla stregua di una zoonosi e in quanto tale ne promuove il monitoraggio anche negli animali (Dir. 2003/99/EC art. 7).

La sua insorgenza e diffusione è certamente associata all'uso talvolta inappropriato delle molecole antimicrobiche in diversi ambiti della medicina umana e veterinaria. Cruciale nel promuovere la selezione di batteri antibiotico-resistenti è soprattutto l'utilizzo di molecole antimicrobiche a dosaggi sub-terapeutici a scopo metafilattico nelle produzioni zootecniche.

Il controllo della sua insorgenza e diffusione richiede innanzitutto una conoscenza approfondita del fenomeno che può essere ottenuta soltanto attraverso l'attuazione di programmi di monitoraggio e di studio mirati.

La presente ricerca è nata con l'obiettivo di valutare la diffusione della resistenza agli antimicrobici in batteri ubiquitari circolanti sia negli allevamenti avi-cunicoli intensivi dove viene comunemente fatto uso di queste molecole, sia nei lagomorfi e volatili a vita libera mai sottoposti a terapie farmacologiche. La scelta di focalizzarsi su ceppi di *E. coli* è invece legata principalmente al fatto che è la specie tra le più diffuse in molteplici nicchie ecologiche sia come batterio commensale che patogeno e, pertanto, adatto per stimare la diffusione del fenomeno (van den Bogaard *et al.*, 2000; EFSA and ECDC, 2012).

La progressiva diffusione di popolazioni batteriche antibiotico-resistenti e soprattutto multifarmaco-resistenti rappresenta certamente una grave minaccia. Questi batteri infatti, sottoposti a pressione selettiva, possono fungere da *reservoir* di geni di resistenza agli antimicrobici, essere selezionati nell'intestino animale e, attraverso la contaminazione ambientale e soprattutto la catena alimentare, raggiungere l'uomo e trasmettere resistenze ai batteri del normale microbiota intestinale umano o ad eventuali patogeni ivi presenti.

Il riscontro delle principali strutture genetiche coinvolte nella diffusione dei determinanti genici di antibiotico-resistenza in un numero elevato di ceppi di *E. coli*, isolati sia da animali d'allevamento che a vita libera, è indicativo di quanto il fenomeno sia diffuso a livello globale. Questa evidenza fotografa certamente un quadro preoccupante e a destare soprattutto allarme è la diffusione di batteri con profili di resistenza a più classi di antimicrobici contemporaneamente. Diversi Autori hanno infatti riscontrato la presenza di plasmidi R veicolanti contemporaneamente più geni di resistenza a diverse classi di antimicrobici. Negli ultimi anni un serio allarme è il riscontro della sempre più diffusa presenza, soprattutto nelle *Enterobacteriaceae*, di plasmidi coniugativi veicolanti contemporaneamente geni di virulenza e responsabili della resistenza o di una ridotta sensibilità a più classi di antimicrobici e in particolare alle cefalosporine di seconda e terza generazione e ai fluorochinoloni, molecole di prima scelta nella terapia delle infezioni in medicina umana. La diffusione di queste strutture garantisce ai batteri che le esprimono di essere selezionati più facilmente sotto la pressione esercitata da molecole antimicrobiche non necessariamente correlate tra loro, pregiudicando così l'efficacia della maggior parte dei trattamenti farmacologici disponibili. Il riscontro di queste strutture in batteri non necessariamente patogeni per l'uomo ma a cui può facilmente venire a contatto soprattutto mediante l'assunzione di carni o acque contaminate, rappresenta certamente una grave minaccia per la salute pubblica, tale da non poter essere ignorata.

La ricerca è nata quindi con l'obiettivo di approfondire lo studio delle principali strutture genetiche coinvolte nella sempre più rapida diffusione di batteri antibiotico-resistenti in animali, talvolta poco studiati, che a vario titolo rientrano tra i possibili veicoli di trasmissione all'uomo di ceppi non necessariamente patogeni, ma che possono pregiudicare notevolmente lo stato di salute e la possibilità di guarigione dalle infezioni future.

Bibliografia

- Abecia, L., Fondevila, M., Balcells, J., Lobley, G.E., McEwan, N.R.** The effect of medicated diets and level of feeding on caecal microbiota of lactating rabbit does. *Journal of Applied Microbiology*, 103:787–793. 2007.
- Agnoletti, F., Deotto, S., Passera, A., Tisato, E., Mazzolini, E.** Diagnosi di colibacillosi nelle sindromi enteriche del coniglio. *Rivista di Coniglicoltura*, 5:40-41. 2004.
- Ahmed, A.M., Shimabukuro, H., Shimamoto, T.** Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella* from retail chicken meat in Japan. *Journal of Food Science*, 74:405-410. 2009.
- Alessiani, A., Di Giannatale, E., Perilli, M., Forcella, C., Amicosante, G., Zilli, K.** Preliminary investigations into fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* strains resistant to nalixidic acid isolated from animal faeces. *Veterinaria Italiana*, 45:521-527. 2009.
- Altalhi, A.D., Gherbawy, Y.A., Hassan, S.A.** Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from retail raw chicken meat in Taif, Saudi Arabia. *Food-borne Pathogens and Disease*, 7:281-285. 2010.
- Altekruse, S.F., Elvinger, F., Lee, K.Y., Tollefson L.K., Pierson, E.W., Eifert, J., Sriranganathan, N.** Antimicrobial susceptibilities of *Escherichia coli* strains from a turkey operation. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221:411-416. 2002.
- Avison, M.B.** New approaches to combating antimicrobial drug resistance. *Genome Biology*, 6:243. 2005.
- Baquirin, M.H.C., Barlow, M.** Evolution and recombination of the plasmidic qnr alleles. *Journal of Molecular Evolution*, 67(1):103–110. 2008.
- Barlow, R.S., Fegan, N., Gobijs, K.S.** Integron-containing bacteria in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *Journal of Applied Microbiology*, 107:540–545. 2009.
- Barnes, J.H., Vaillancourt, J.P., Gross, W.B.** Colibacillosis. In: Saif Y.M. *et al.*, Diseases of Poultry, 11th edition, Ames, Iowa State Press, USA, 631-656. 2003.
- Barnes, J.H., Nolan, L.K., Vaillancourt, J.P.** Colibacillosis. In: Saif, Y.M. *et al.*, Diseases of Poultry, 12th edition, Ames, Iowa State Press, USA, 691-737. 2008.
- Barraud, O., Baclet, M.C., Denis, F., Ploy, M.C.** Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65:1642-1645. 2010.

- Barza, M.** Potential Mechanisms of Increased Disease in Humans from Antimicrobial Resistance in Food Animals. *Clinical Infectious Diseases*, 34:123-125. 2002.
- Bass, L., Liebert, C.A., Lee, M.D., Summers, A.O., White, D.G., Thayer, S.G., Maurer, J.J.** Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:2925-2929. 1999.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45:493-496. 1966.
- Bazile-Pham-Khac, S., Troung, Q.C., Lafont, J.P., Gutmann, L., Zhou, X.Y., Osman, M., Moreau, N.J.** Resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolated from poultry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40:1504-1507. 1996.
- Biskri, L., Mazel, D.** Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47:3326-3331. 2003.
- Biyela, P.T., Lin, J., Bezuidenhout, C.C.** The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Water Science and Technology*, 50:45-50. 2004.
- Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco J., Mora, A., Balaguer, L., Mourini, M., Juarez, A., Jansen, W.H.** O serogroups, biotypes, and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *Journal of Clinical Microbiology*, 34:3101-3107. 1996.
- Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., Blanco, J.** Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *Journal of Clinical Microbiology*, 35:2953-2957. 1997.
- Brown, H. J., Stokes, H.W., Hall, R.M.** The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. *Journal of Bacteriology*, 178:4429-4437. 1996.
- Byarugaba, D.K.** Mechanisms of Antimicrobial Resistance. In: de J. Sosa A., *et al.*, *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*, DOI 10.1007/978-0-387-89370-9_2, Springer Science Business Media, LLC. 2009.
- Camarda, A., Pennelli, D., Battista, P., Martella, V., Greco, L., Alloggio, I., Mazzolini, E.** Virulence genes and antimicrobial resistance patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* from rabbits in Southern Italy. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, 470-476. 2004.

- Campbell, A.** Evolutionary significance of accessory DNA elements in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 35:55-83. 1981.
- Carattoli, A.** Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, 32:243-259. 2001.
- Carattoli, A.** Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Current Issues in Molecular Biology*, 5:113-122. 2003.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., Threlfall, E.J.** Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiology and Methods*, 63:219-28. 2005.
- Carattoli, A., Miriagou, V., Bertini, A., Loli, A., Colinon, C., Villa, L., Whichard, J.M., Rossolini, G.M.** Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerging Infectious Diseases*, 12:1145-1148. 2006.
- Carattoli, A.** Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:2227-2238. 2009.
- Carattoli, A.** Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*, 301:654-658. 2011.
- Cattoir, V., Poirel, L., Nordmann, P.** Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52:3801-3804. 2008.
- Cavaco, L. M., Frimodt-Moller, N., Hasman, H., Guardabassi, L., Nielsen, L., Aarestrup, F.M.** Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microbial Drug Resistance*, 14:163-169. 2008.
- Cavaco, L.M., Hasman, H., Xia, S., Aarestrup, F.M.** *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovars Kentucky and Bovis morbificans of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:603-608. 2009.
- Cengiz, M., Buyukcangaz, E., Arslan, E., Mat, B., Sahinturk, P., Sonal, S., Gocmen, H., Sen, A.** Molecular characterization of quinolone resistance in *Escherichia coli* from animals in Turkey. *The Veterinary Record*, 171:155,1-4. 2012.
- Cerquetti, M., García-Fernández, A., Giufrè, M., Fortini, D., Accogli, M., Graziani, C., Luzzi, I., Caprioli, A., Carattoli, A.** First report of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* in an *Escherichia coli* strain of animal origin in Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53:3112-3114. 2009.

Chah, K.F., Agbo, I.C., Eze, D.C., Somalo, S., Estepa, V., Torres, C. Antimicrobial resistance, integrons and plasmid replicon typing in multiresistant clinical *Escherichia coli* strains from Enugu State. Nigeria. *Journal of Basic Microbiology*, 50:S18–S24. 2010.

Chen, X., Zhang, W., Pan, W., Yin, J., Pan, Z., Gso, S., Jiao, X. Prevalence of *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals and the environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56:3423–3427. 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute (ex NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, 2nd edition. M31-A2, vol.22, no.6. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2002.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; approved Standard, 9th edition. M2-A9, vol. 26, no. 1. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA, USA. 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. M100-S17, vol. 26, no. 3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2007.

Collignon, P., Angulo, F.J. Fluoroquinolone resistant *Escherichia coli*: food for thought. *The Journal of Infectious Diseases*, 194:8–10. 2006.

Collis, C.M., Hall, R.M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39:155–162. 1995.

Collis, C. M., Kim, M. J., Stokes, H. W., Hall, R. M. Integron-encoded *IntI* integrases preferentially recognize the adjacent cognate *attI* site in recombination with a 59-be site. *Molecular Microbiology*, 46:1415–1427. 2002.

Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2011. Société Française de Microbiologie, Paris, France. 2011.

Corkill, J.E., Anson, J.J., Hart, A.C. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56:1115–1117. 2005.

Cormican, N., Buckley, V., Corbett-Feeney, G., Sheridan, F. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from turkeys and hens in Ireland. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48:587–588. 2001.

Courvalin, P. Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 264:4-16. 2008.

Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L., Maas, W.K. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological Reviews*, 52:375-95. 1988.

Croxen, M.A., Finlay, B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature reviews. Microbiology*, 8:26-38. 2010.

Da Re, S., Garnier, F., Guerin, E., Campoy, S., Denis, F., Ploy, M.C. The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression. *EMBO reports*, 10:929-933. 2009.

Daikos, G.L., Kosmidis, C., Tassios, P.T., Petrikkos, G., Vasilakopoulou, A., Psychogiou, M., Stefanou, I., Avlami, A., Katsilambros, N. Enterobacteriaceae Blood- stream infections: presence of integrons, risk factors, and outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51:2366-2372. 2007.

Dalhoff, A. Global Fluoroquinolone Resistance Epidemiology and Implications for Clinical Use. Hindawi Publishing Corporation Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, article ID 976273, doi:10.1155/2012/976273. 2012.

Datta, N., Hedges, R.W. Compatibility groups among *fi* - R factors. *Nature*, 234:222-3. 1971.

DebRoy, C., Sidhu, M.S., Sarker, U. Jayarao, B.M. Stell A.L., Bell, N.P., Johnson, T.J. Complete sequence of pEC14-114, a highly conserved IncFIB/FIIA plasmid associated with uropathogenic *Escherichia coli* cystitis strains, and its prevalence among Extraintestinal Pathogenic isolates from humans and animals. *Plasmid*, 63: 53-60. 2010.

Decreto Legge 4 aprile 2006, n. 191. Attuazione della direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici. *Gazzetta Ufficiale* n. 119 del 24 maggio 2006.

Dionisi, A.M., Lucarelli, C., Owczarek, S., Luzzi, I., Villa, L. Characterization of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrB19* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:4019-4021. 2009.

Dionisi, A.M., Filetici, E., Owczarek, S., Arena, S., Benedetti, I., Lucarelli, C., Luzzi, I., Scavia, C., Minelli, F., Ciaravino, G., Marziano, M.L., Caprioli, A. e i laboratori della rete Enter-net Italia. Enter-net: sorveglianza delle infezioni trasmesse da alimenti e acqua. Rapporto dell'attività 2007-2009. AIVEMP newsletter, anno 8, n. 2. 2011.

Direttiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003. Sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la di-

rettiva 92/117/CEE del Consiglio. Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea, 12.12.2003.

Dobrindt, U., Hentschel, U., Kaper, J.B., Hacker, J. Genome plasticity in pathogenic and nonpathogenic enterobacteria. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 264:157-175. 2002.

Dolejska, M., Duskova, E., Rybarikova, J., Janoszowska, D., Roubalova, E., Dibdakova, K., Maceckova, G., Kohoutova, L., Literak, I., Smola, J., Cizek, A. Plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66:757-764. 2011.

Dolejska, M., Villa, L., Hasman, H., Hansen, L., Carattoli, A. Characterization of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68:333-339. 2013.

Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J., Zhao, X. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52:385-392. 2008.

Ekkapobyotin, C., Padungtod, P., Chuanchuen, R. Antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolates from swine. *International Journal of Food Microbiology* 128: 325-8. 2008.

Endtz, H.P., Ruijs, G.J., van Klingeren, B., Jansen, W.H., van der Reyden, T., Mouton, R.P. Quinolone resistance in *campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *The The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27:199-208. 1991.

Engberg, J., Aarestrup, F.M., Smidt, P.G., Nachamkin, I., Taylor, D.E.. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *coli*: A review of mechanisms and trends over time of resistance profiles in human isolates. *Emerging Infectious Diseases*, 7:24-34. 2001.

European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2011. doi 10.2900/14911. 2011.

European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2012. doi 10.2900/6551. 2012.

European Centre for Disease Prevention and Control and European Medicines Agency. Joint Technical Report. The bacterial challenge: time to react. A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. EMEA/576176/2009, Stockholm: EMEA; 2009.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. EFSA Journal, 9:2154. 2011.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. EFSA Journal, 10:2598. 2012.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. The EFSA Journal, 10:2597. 2012 food.

European Food Safety Authority. AHAW Panel, The Impact of the current housing and husbandry systems on the health and welfare of farmed domestic rabbits. Annex to the EFSA Journal, 267, 1-31. 2005.

European Food Safety Authority. Working Group on Developing Harmonised Schemes for Monitoring Antimicrobial Resistance in Zoonotic Agents. Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* isolates from food animals in the European Union. Clinical Microbiology and Infection, 14:522-533. 2008a.

European Food Safety Authority. Scientific opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. The EFSA Journal, 765:1-87. 2008b.

European Food Safety Authority. The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007. EFSA Journal, 8:1309. 2010a.

European Food Safety Authority. The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008. EFSA Journal, 8:1658. 2010b.

European Food Safety Authority. The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2009. EFSA Journal, 9:2154. 2011.

European Food Safety Authority. Zoonoses monitoring. Italy: The Report referred to in Article 9 of Directive 2003/99/EC. Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in humans, doodsuffs, animals and feedingstuffs in 2010. 2010. 2012.
(<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/zoocountryreport09it.pdf>).

European Medicines Agency and Veterinary Medicines and Inspections. Public statement on the use of (fluoro)quinolones in food-producing animals in

the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. *emea/cvmp/sagam/184651/2005*. 2007.

Flores, C., Qadri, M. I., Lichtenstein, C. DNA sequence analysis of five genes: *tnsA*, *B*, *C*, *D* and *E*, required for Tn7 transposition. *Nucleic Acids Research*, 18:901-911. 1990.

Fluit, A. C., Schmitz, F. J. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*, 10:272-288. 2004.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, F.A.O. World production of meat in 2010. FAOSTAT © FAO Statistics Division 2012, date accessed: 30/12/2012 (<http://faostat.fao.org/>).

Forcella, C., Alessiani, A., Perilli, M., Zilli, K., Di Giannatale, E., Amico-sante, G. Characterization of quinolone resistance in *Escherichia coli* strains of animal origin from Italy. *Journal of Chemotherapy*, 22:165-168. 2010.

Fortini, D., Fashae, K., Garcia-Fernandez, A., Villa, L., Carattoli, A. Plasmid-mediated quinolone resistance and beta-lactamase in *Escherichia coli* from healthy animals from Nigeria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66:1268-1272. 2011.

Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., Toussaint, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews, Microbiology*, 3:722-732. 2005.

García-Fernández, A., Fortini, D., Veldman, K., Mevius, D., Carattoli, A. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63:274-81. 2009.

Gibson, J.S., Cobbold, R.N., Heisig, P., Sidjabat, H.E., Kyaw-Tanner, M.T., Trott, D.J. Identification of *qnr* and *aac(6)-1b-cr* plasmid-mediated fluoroquinolone resistance determinants in multidrug-resistant *Enterobacter* spp. isolated from extraintestinal infections in companion animals. *Veterinary Microbiology*, 143:329-336. 2010.

Gionechetti, F., Dolzani, L., Gombac, F., Lavenia, A., Tonin, E. A., Lagatolla, C., Banfi, E., Zucca, P., Monti-Bragadin, C. Integroni di classe 1 ed antibiotico resistenze in batteri gram-negativi isolate da *Larus cachinnans michahellis*. *Giornale Italiano di Microbiologia Medica Odontoiatrica e Clinica*, 4:57-59. 2002.

Giraud, E., Leroy-Setrin, S., Flaujac, G., Cloeckert, A., Dho-Moulin, M., Chaslus-Dancla, E. Characterization of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* O78:K80 isolated from turkeys. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 341-343. 2001.

Glisson, J.R., Hofacre, C.L., Mathis, G.F. Comparative efficacy of enrofloxacin, oxytetracycline, and sulfadimethoxine for the control and mortal-

ity caused by *Escherichia coli* in broiler chickens. *Avian Diseases*, 48:658-662. 2004.

Grilli, G., Ferrazzi, V., Agnoletti F., Piccirillo, A., Pisoni, A.M., Gallazzi, D. La patologia enterica nel coniglio da carne allevato in Italia. *Rivista di Zootecnia e Veterinaria*, 34:51-56. 2006.

Grilli, G. Studio sull' Antibiotico Resistenza dei più comuni patogeni nell'allevamento cunicolo. Progetto di ricerca nell'ambito del Programma di Miglioramento della Qualità della Gestione dell'offerta delle Produzioni cunicole e di Rafforzamento dei Prodotti di Filiera. Azione 4.5. 2008.

Guardabassi, L., Kruse, H. Principles of prudent and rational use of antimicrobials in animals. In: Guardabassi, L., Kruse, H., Jensen, L.B., Guide to antimicrobials use in animals, Oxford UK, Blackpawell Publishing Ltd, 1-11. 2008.

Guenther, S., Ewers, C., Wieler, L.H. Extended Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. coli* Wildlife, yet Another Form of Enviromental Pollution? *Frontiers in Microbiology*, 2:246. 2011.

Guenther, S., Aschenbrenner, K., Stamm, I., Bethe, A., Semmler, T., Stubbe, A., Stubbe, M., Batsaikhan, N., Glupczynski, Y., Wieler, L.H., Ewers, C. Comparable High Rates of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Birds of Prey from Germany and Mongolia. *PloS One*, 7: 53039. 2012.

Guerri Santos, M.L., Rotger, R. Change in resistance to quinolones and betalactams in different serogroups of *Salmonella* during the last decade in a Madrid hospital. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 17:37-43. 2004.

Gyles, C.L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Animal Health Research Review*, 9:149-158. 2008a.

Gyles, C.L., Fairbrother, J.M. *Escherichia coli*. In: Gyles, C.L., Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3th edition, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, ch. no. 16. 2008b.

Hall, R.M., Brookes, D.E., Stokes, H.W. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Molecular Microbiology*, 5:1941-1959. 1991.

Hansen, L.H., Johannesen, E., Burmolle, M., Sorensen, A.H., Sorensen, S.J. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48:3332-3337. 2004.

Hansen, L.H., Sorensen, S.J., Jorgensen, H.S., Jensen, L.B. The prevalence of the OqxAB multidrug efflux pump amongst olaquinox-resistant *Escherichia coli* in pigs. *Microbial Drug Resistance*, 11:378-382. 2005.

- Hansen, L.H., Jensen, L.B., Sorensen, H.I., Sorensen, S.J.** Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60:145-147. 2007.
- Hansson, K., Sundstrom, L., Pelletier, A., Roy, P.H.** IntI2 integron integrase in Tn7. *Journal of Bacteriology*, 184:1712-1721. 2002.
- Harbottle, H., Thakur, S., Zhao, S., White, G.** Genetics of Antimicrobial resistance. *Animal Biotechnology*, 17:111-124. 2006.
- Hart W.S., Heuzenroeder M.W., Barton M.D.** A study of the transfer of tetracycline resistance genes between *Escherichia coli* in the intestinal tract of a mouse and a chicken model. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 53:333-340. 2006.
- Hassan, W.M., Hashim, A., Domany, R.** Plasmid mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qep* in ESBL-producing *Escherichia coli* clinical isolates from Egypt. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 30:442-447. 2012.
- Hernandez, A., Sanchez, M.B., Martinez, J.L.** Quinolone-resistance: much more than predicted. *Frontiers in Microbiology*, 2:1-6. 2011.
- Ho, P.L., Chow, K.H., Lai, E.L., Lo, W.U., Yeung, M.K., Chan, J., Chan, P. Y., Yuen, K. Y.** Extensive dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* with multidrug resistance to "critically important" antibiotics among food animals in Hong Kong, 2008-10. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66:765-768. 2011.
- Hochhut, B., Waldor, M.K.** Site specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. *Molecular Microbiology*, 32:99-110. 1999.
- Hooper, D.C.** Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 7:337-341. 2001.
- Hooper, D.C.** Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 31:24-28. 2000.
- Hordijk, J., Bosman, A.B., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Dierikx, C., Wagenaar, J.A., Mevius, D.** *qnrB19* gene bracketed by IS26 on a 40-kilobase IncR plasmid from an *Escherichia coli* isolate from a veal calf. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55:453-454. 2011.
- Hsueh, P.R., Teng, L.J., Tseng, S.P., Chang, C.F., Wan, J.H., Yan, J.J., Lee, C.M., Chuang, Y.C., Huang, W.K., Yang, D., Shyr, J.M., Yu, K.W., Wang, L.S., Lu, J.J., Ko, W.C., Wu, J.J., Chang, F.Y., Yang, Y.C., Lau, Y.J., Liu, Y.C., Liu, C.Y., Ho, S.W., Luh, K.T.** Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium and *Choleraesuis* from pigs to humans, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases*, 10:60-68. 2004.

Huang, S.Y., Zhu, X.Q., Wang, Y., Liu, H.B., He, J.K., Dai, L., Li, B.B., Wu, C.M., Shen, J.Z. Co-carriage of *qnrS1*, *floR*, and *bla*(CTX-M-14) on a multi-drug-resistant plasmid in *Escherichia coli* isolated from pigs. *Foodborne pathogens and disease*, 9:896-901. 2012.

Istituto Superiore di Sanità. AR-ISS: sorveglianza dell'antibiotico-resistenza in Italia. Rapporto del triennio 2006-2008. Rapporti ISTISAN 10/37. ISSN 1123-3117. 2010.

Jacoby, G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 41:120-126. 2005.

Jacoby, G.A., Walsh, K.E., Mills, D.M., Walker, V.J., Oh, H., Robicsek, A., Hooper, D.C. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:1178-82. 2006.

Jacoby, G.A., Cattoir, V., Hooper, D., Martínez-Martínez, L., Nordmann, P., Pascual, A., Poirel, L., Wang, M. *qnr* gene nomenclature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52:2297-2299. 2008.

Jardine, C.M., Janecko, N., Allan, M., Boerlin, P., Chalmers, G., Kozak, G., McEwen, S.A., Reid-Smith, R.J. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from raccoons (*Procyon lotor*) In Southern Ontario, Canada. *Applied Environmental Microbiology*, 78:3873-3879. 2012.

Johnson, J.R., Murray, A.C., Gajewsk, A., Sullivan, M., Snippes, P., Kuskowisk, M.A., Smith, K.E. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47:2161-2168. 2003.

Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Menard, M., Gajewski, A., Xercavins, M., Garau, J. Similarity of human and chicken *Escherichia coli* isolates with relation to ciprofloxacin resistance status. *The Journal of Infectious Diseases*, 194:71-78. 2006.

Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Johnson, S.J., Logue, C.M., White, D.G., Doetkott, C., Nolan, L.K. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:1976-1983. 2007.

Johnson, T.J., Jordan, D., Kariyawasam, S., Stell, A.L., Bell, N.P., Wannemuehler, Y.M., Alcaron, C.F., Li, G., Tivendale, K.A., Logue, C.M., Nolan, L.K. Sequence analysis and characterization of a transferrable hybrid plasmid encoding multidrug resistance and enabling zoonotic potential for extraintestinal *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 78:1931-1942. 2010.

Johnson, T.J., Bielak, A.E., Fortini, D., Hestbjerg Hansen, L.C., Hasman, H., Debroy, C., Nolan, L.K., Carattoli, A. Expansion of the IncX plasmid fam-

ily for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Plasmid*, 68:43-50. 2012.

Jouini, A., Ben Slama, K., Saenz, Y., Klibi, N., Costa, D., Vinué, L., Zarazaga, M., Boudabous, A., Torres, C. Detection of multiple-antimicrobial resistance and characterization of the implicated genes in *Escherichia coli* isolates from food of animal origin in Tunis. *Journal of Food Protection*, 72:1082-1088. 2009.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, 2:123-140. 2004.

Khaitisa, M.L., Oloya, J., Doetkott, D., Kegode, R. Antimicrobial resistance and association with class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from turkey meat products. *Journal of Food Protection*, 71:1679-84. 2008.

Kim, H.B., Wang, M., Park, C.H., Kim, E.C., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:3582-3584. 2009.

Kim, T.E., Jeong, Y.W., Cho, S.H., Kim, S.J., Kwon, H.J. Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in Korean Avian Pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Journal Clinical Microbiology*, 45:3309-3315. 2007.

Klare, I., Werner, G., Witte, W. Enterococci. Habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. *Contributions to Microbiology*, 8:108-122. 2001.

Koo, H.J., Woo, G.J. Characterization of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* recovered from foods of animals and fish origin in Korea. *Journal of Food Protection*, 75 (5):966-972. 2012.

Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., Weijdegård, B., Söderström, H., Larsson, D.G.J. Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PLoS One*, 6: e17038. 2011.

Kubo, K.M., Craig, N.L. Bacterial transposon Tn7 utilizes two different classes of target sites. *Journal of Bacteriology*, 172:2774-2778. 1990.

Lanz, R., Kuhnert, P., Boerlin, P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary Microbiology*, 91:73-84. 2003.

Lapierre, L., Cornejo, J., Borie, C., Toro, C., San Martín, B. Genetic characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and class 2 integrons in commensal strains of *Escherichia coli* isolated from poultry and swine. *Microbial Drug Resistance*, 14:265-72. 2008.

- Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., Petit, F.** Occurrence of antibiotic resistance and class1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiology Ecology*, 68:118-130. 2009.
- Lavilla, S., Gonzalez-Lopez, J.J., Sabate, M., Garcia-Fernandez, A., Larrosa, M.N., Bartolome, R.M., Carattoli, A., Prats, G.** Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum-beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61:291-295. 2008.
- Lenski, R.E.** Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *International Microbiology*, 1:265-70. 1998.
- Leverstein-van Hall, M.A., Blok, H.E.M., Donders, A.R.T., Paauw, A., Fluit, A.C., Verhoef, J.** Multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *The Journal of Infectious Diseases*, 187:251-259. 2003.
- Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., Roy, P. H.** PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39:185-191. 1995.
- Lewin, C.S., Amyes, S.G.B.** The role of the SOS response in bacteria exposed to zidovudine or trimethoprim. *Journal of Medical Microbiology*, 34:329-332. 1991.
- Li, M.C., Wang, F., Li, F.** Identification and molecular characterization of antimicrobial-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail meat products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8:489-493. 2011.
- Literak, I., Dolejska, M., Rybarikova, J., Cizek, A., Strejckova, P., Vyskocilova, M., Friedman, M., Klimes, J.** Highly variable patterns of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolates from pigs, sympatric rodents, and flies. *Microbial Drug Resistance*, 15:229-237. 2009.
- Liu, B.T., Wang, X.M., Liao, X.P., Sun, J., Zhu, H.Q., Chen, X.Y., Liu, Y.H.** Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *oqxAB* and *aac(6')-Ib-cr* and extended-spectrum beta-lactamase gene *blaCTX-M-24* co-located on the same plasmid in one *Escherichia coli* strain from China. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66:1638-1639. 2011.
- Löhren, U., Ricci, A., Cummings, T.S.** Guidelines for antimicrobial use in poultry. In: Guardabassi, L., Kruse, H., Jensen, L B., Guide to antimicrobials use in animals, Oxford UK, Blackpawell Publishing Ltd, 126-141. 2008.
- Lucey B., Cryan, B., O'Halloran, F., Wall, P.G., Buckley, T., Fanning, S.** Trends in antimicrobial susceptibility among isolates of *Campylobacter* species in Ireland and the emergence of resistance to ciprofloxacin. *The Veterinary Record*, 151:317-320. 2002.

- Lutful Kabir, S.M.** Avian Colibacillosis and Salmonellosis: a Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7:89-114. 2010.
- Ma, J., Zeng, Z., Chen, Z., Xu, X., Wang, X., Deng, Y., Lu, D., Huang, L., Zhang, Y., Liu, J., Wang, M.** High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:519-534. 2009.
- Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., Sousa, J. C., Peixe, L.** Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62:296-302. 2008.
- Madiyarov, R.S., Bektemirov, A.M., Ibadova, G.A., Abdukhalilova, G.K., Khodiev, A. V., Bodhidatta, L., Sethabutr, O., Mason, C J.** Antimicrobial resistance patterns and prevalence of class 1 and 2 integrons isolated in *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* isolated in Uzbekistan. *Gut Pathogens*, 2:18. 2010.
- Magnet, S., Blanchard, J.S.** Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chemical Reviews*, 105:477-497. 2005.
- Mahillon, J., Leonard, C., Chandler, M.** IS elements as constituents of bacterial genomes. *Research in Microbiology*, 150:675-687. 1999.
- Marimon, J.M., Gomariz, M., Zigorraga, C, Cilla, G., Perez-Trallero, E.** Increasing prevalence of quinolone resistance in human nontyphoid *Salmonella enterica* isolates obtained in Spain from 1981 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 3789-3793. 2004.
- Marti, E., Balcazar, J.L.** Real-time PCR assays for quantification of *qnr* genes in environmental water samples and chicken feces. *Applied Environmental Microbiology*. PMID:23275512. 2012.
- Martinez, E., de la Cruz, F.** Genetic elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. *EMBO Journal*, 9:1275-1281. 1990.
- Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Jacoby, G.A.** Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet*, 351:797-799. 1998.
- Maturana, V.G., de Pace, F., Carlos, C., Pires, M.M., de Campos, T.A., Nakazato, G., Sthelling, E., Logue, C.M., Nolan, L.K., da Silveira, W.D.** Subpathotypes of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Exist a Defined by their Syndromes and Virulence Traits, *The Open Microbiology Journal*, 5:55-64. 2011.

- Mazel, D.** Bacterial genetics and antibiotic resistance dissemination. In: Hughes, D., Andersson, D., Antibiotic development and resistance. Taylor and Francis, London, New York, ch. no. 6. 2001.
- Mazel, D.** Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews. Microbiology* 4: 608-620. 2006.
- McCarty, M., H. E. Taylor, and O. T. Avery.** Biochemical studies of environmental factors essential in transformation of pneumococcal types. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 11:583. 1946.
- McDermott, P.F., Walker, R.D., White, D.G.** Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *International Journal of Toxicology*, 22:135-143. 2003.
- McManus, MC.** Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health-System Pharmacists*, 54:1420-1433. 1997.
- Miles, T., McLaughlin, W., Brown, P.** Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. *BMC Veterinary Research*, 2:7. 2006.
- Miller, C., Thomsen, L.E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., Cohen, S.N.** SOS response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 305:1629-1631. 2004.
- Mokracka, J., Gruszczynska, B., Kaznowski, A.** Integrons, beta-lactamase and *qnr* genes in multidrug resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *P. vulgaris*. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 120:950-958. 2012.
- Moon, H.W., Wliipp, S.C., Argcnzio, R.A., Levine, M.M., Giannella, R.A.** Attaching and effacing activities on rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infection and Immunity*, 41:1340-1351. 1983.
- Moyenuddin, M., Wachsmuth, I.K., Moseley, S.L., Bopp, C.A., Blake P.A.** Serotype, antimicrobial resistance, and adherence properties of *Escherichia coli* strains associated with outbreaks of diarrheal illness in children in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 27:2234-2239. 1989.
- Nandi, S., Maurer, J.J., Hofacre, C., Summers, A.O.** Gram-positive bacteria are a major reservoir of class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101:7118-7122. 2004.
- Nebbia, P., Tramuta, C., Giammarino, M., Ambrogi, C., Salvarani, S., Marotta, A., Robino, P.** Antimicrobial resistance, class 1 and 2 integrons and gene cassettes in avian *Escherichia coli*. *Italian Journal of Animal Science*, 7:391-395. 2008.

- Nesvera, J., Hochmannova, J., Patek, M.** An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiology Letters, 169: 391-395. 1998.
- Nijssen, S., Florijn, A., Top, J., Willems, R., Fluit, A., Bonten, M.** Unnoticed spread of integron- carrying *Enterobacteriaceae* in intensive care units. Clinical Infectious Diseases, 41,1-9. 2005.
- Novais, A., Canton, R., Valverde, A., Machado, E., Galan, J.C., Peixe, L., Carattoli, A., Baquero, F., Coque, T.M.** Dissemination and persistence of *bla*CTX-M-9 are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-alpha, and IncFI groups. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50:2741-2750. 2006.
- Novick, R.P.** Plasmid incompatibility. Microbiological Reviews, 51:381-95. 1987.
- Ochman, H., Lawrence, J.G., Groisman, E.A.** Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature, 405:299--04. 2000.
- Pallecchi, L., Riccobono, E., Sennati, S., Mantella, A., Bartalesi, F., Trigo, C., Gotuzzo, E., Bartoloni, A., Rossolini, G.M.** Characterization of small ColE-like plasmids mediating widespread dissemination of the *qnrB19* gene in commensal enterobacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54:678-82. 2010.
- Park, K.S., Kim, H.M., Park, T.S., Nam, Y.S., Lee, H.J., Suh, J.T.** Prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance genes, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* and *oqxAB* in clinical isolates of extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* in Korea. Annals of Clinical and Laboratory Science, 42:191-197. 2012.
- Partridge, S.R.** Letters to the Editor: Correctly Identifying the Streptothricin Resistance Gene Cassette. Journal of Clinical Microbiology, 43:4298-4300. 2005.
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J.R.** Gene cassettes and cassette array in mobile resistance integrons. FEMS Microbiological Reviews, 33:757-784. 2009.
- Paton, J.H., Reeves, D.S.** Fluoroquinolone antibiotics. Microbiology, pharmacokinetics and clinical use. Drugs, 36:193-228. 1988.
- Pembroke, J.T., Murphy, D.B.** Isolation and analysis of a circular form of the *incJ* conjugative transposon-like elements, R391 and R997: implications for *IncJ* incompatibility. FEMS Microbiology Letters, 187:133-138. 2000.
- Penn, O., Privman, E., Ashkenazy, H., Landan, G., Graur, D. and Pupko, T.** GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores.

Nucleic Acids Research, 1:38; (Web Server issue): W23-W28; doi: 10.1093/nar/gkq443. 2010.

Penteado, A.S., Ugrinovich, L.A., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Andrade, J.R.C., Correa, S.S., Pestana De Castro, A.F. Serobiotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil 2002. *Veterinary Microbiology*, 89:41-51. 2002.

Périchon, B., Courvalin, P., Galimand, M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51:2464-2469. 2007.

Perry, J.J., Staley, J.T., Lory, S. Microbiologia, fisiologia, genetica, virologia, evoluzione e diversità. Zanichelli Editore, 290-308. 2004.

Peters, J.E., Craig, N.L. Tn7: smarter than we thought. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2:806-814. 2001.

Pillien, F., Chaiarcng, C., Boury, M., Tasca, C., De Rycke, J., Milon, A. Role of adhesive factor/rabbit 2 in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* O:103 diarrhea of weaned rabbit. *Veterinary Microbiology*, 50:105-115. 1996.

Pisoni, A.M., Piccirillo, A., Gallazzi, D., Agnoletti, F., Grilli, G. Biotypes and susceptibility to antimicrobial agents rabbit *Escherichia coli*. *Proc 8th World Rabbit Congress*, Sept 7-10, 2004, Puebla – Mexico, 608-613. 2004.

Ploy, M.C., Lambert, T., Gassama, A., Denis, F. Place des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. *Annales de Biologie Clinique*, 58: 439-444. 2000a.

Ploy, M.C., Denis, F., Courvalin, P., Lambert, T. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44:2684-2688. 2000b.

Poeta, P., Radhouani, H., Goncalves, A., Figueiredo, N., Carvalho, C., Rodrigues, J., Igrejas, G. Genetic Characterization of Antibiotic Resistance in Enteropathogenic *Escherichia coli* Carrying Extended-Spectrum beta-Lactamases Recovered from Diarrhoeic Rabbits. *Zoonoses and Public Health*, 57:162-170. 2010.

Poirel, L., Cattoir, V., Nordmann, P. Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (4):295-297. 2008.

Poirel, L., Cattoir, V., Nordmann, P. Plasmid-mediated quinolone-resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Frontiers in Microbiology*, 3:1-7. 2012.

- Ponce-Rivas, E., Munoz-Marquez, M.E., Khan, A.A.** Identification and molecular characterization of class 1 integrons in multiresistant *Escherichia coli* isolates from poultry litter. *Applied Environmental Microbiology*, 78:5444-5447. 2012.
- Prescott, J.F., Baggot J.D., Walker, R.D.** Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 3th edition, Iowa State University Press, Ames, Iowa. 2000.
- Radstrom, P., Skold, O., Swedberg, G., Flensburg, J., Roy, P.H., Sundstrom L.** Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *Journal of Bacteriology*, 176:3257-3268. 1994.
- Ramirez, M.S., Vargas, L.J., Cagnoni, V., Tokumoto, M., Centron, D.** Class 2 integron with a novel cassette array in a *Burkholderia cenocepacia* isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:4418-4420. 2005.
- Reaney, D.** Extrachromosomal elements as possible agents of adaptation and development. *Bacteriology Reviews*, 40:552-90. 1976.
- Recchia, G.D., Hall, R.M.** Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*. 141:3015-3027. 1995.
- Rice, L.B., Sahm, D.F., Bonomo, R.A.** Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A., Tenover, R.H., *Manual of Clinical Microbiology*, 8th edition, ASM Press, Washington, D.C. 2008-2107. 2003.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C.H., Bush, K., Hooper, D.C.** Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12:83-88. 2006.
- Rodriguez, I., Martin, C., Mendoza, C., Rodicio, R.** Class 1 and class 2 integron in non-prevalent serovars of *Salmonella enterica*: structure and association with transposons and plasmids. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58:1124-1132. 2006.
- Rodríguez-Martínez, J.M., Cano, M.E., Velasco, C., Martínez-Martínez, L., Pascual, A.** Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 17:149-182. 2011.
- Rodriguez-Martinez, J.M., Diaz de Alba, P., Briales, A., Machuca, J., Lossa, M., Fernandez-Cuenca, F., Rodriguez Bano, J., Martinez-Martinez, L., Pascual, A.** Contribution of oqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68:68-73. 2013.

Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Johnson, T.J., Fahr, M., Doetkott, C., Nola, L.K. Comparison of *Escherichia coli* implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, 151:2097-2110. 2005.

Rowe-Magnus, D.A., Mazel, D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology*, 292:115-125. 2002.

Ruiz, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51:1109-17. 2003.

Rush, M.G., Misra, R. Extrachromosomal DNA in eucaryotes. *Plasmid*, 14:177-91. 1985.

Russo, T.A., Johnson, J.R. Proposal of a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181:1753-1754. 2000.

Russo, T.A., Johnson, J.R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli* : focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, 5: 449-456. 2003.

Salmon, S.A., Watts, J.L. Minimum inhibitory concentration determinations for various antimicrobial agents against 1570 bacterial isolates from turkey poult. *Avian Diseases*, 44:85-98. 2000.

Salyers, A.A., Amabile-Cuevas, C.F. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41:2321-2325. 1997.

Sayah, R.S., Kaneene, J.B., Johnson, Y., Miller, R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Applied Environmental Microbiology*, 71:1394-1404. 2005.

Schink, A.K., Kadlec, K., Schwarz, S. Detection of *qnr* genes among *Escherichia coli* isolates of animal origin and complete sequence of the conjugative *qnrB19*-carrying plasmid pQNR2078. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67:1099-1102. 2012.

Silva, N., Igrejas, G., Figueiredo, N., Gonçalves, A., Radhouani, H., Rodrigues, J., Poeta, P. Molecular characterization of antimicrobial resistance in enterococci and *Escherichia coli* isolates from European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Science of the Total Environment*, 408:4871-4876. 2010.

Sjölund, M., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Bengtsson, S., Cederbrant, G., Pinhassi, J., Kahlmeter, G., Olsen, B. Dissemination of Multidrug-Resistant Bacteria into the Arctic. *Emerging infectious diseases*, 14:70-72. 2008.

- Skurnik, D., LeMenach, A., Zurakowski, D., Mazel, D., Courvalin, P., Denamur, E., Andremont, A., Ruimy, R.** Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:3062-3065. 2005.
- Smith, J.L., Drum, D.J., Dai, Y., Kim, J.M., Sanchez, S., Maurer, J.J., Hofacre, C.L., Lee, M.D.** Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:1404-1414. 2007.
- Sojka, W.J., Carnaghan, R.B.A.** *Escherichia coli* infections in poultry. *Research in Veterinary Science*, 2:340-352. 1962.
- Soufi, L., Abbassi, M.S., Saenz, Y., Vinuè, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Abbas, A., Dbaya, R., Khanfir, L., Ben Hassen, A., Hammami, S., Torres, C.** Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6:1067-73. 2009
- Spratt, B.G.** Resistance to antibiotics mediated by target alterations, *Science*, 264:388-393. 1994.
- Stamatakis, A.** RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models. *Bioinformatics*, 22:2688-2690. 2006.
- Stephenson, S.A., Brown, P.D.** Occurrence of class 1 integrons in uropathogenic fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* isolates from Jamaica. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 2012. Doi:10.1111/j.1600-0463.2012.02960.x. 2012.
- Stokes, H.W., Hall, R.M.** A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Molecular Microbiology*, 3:1669-1683. 1989.
- Stokes, H.W., Nesbo, C.L., Holley, M., Bahl, M.I., Gillings, M.R., Boucher, Y.** Class 1 integrons potentially predating the association with tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community. *Journal of Bacteriology*, 188:5722-5730. 2006.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A.** Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiological Reviews*, 22:664-89. 2009.
- Sunde, M.** Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56:1019-1024. 2005.

- Sunde, M., Norström M.** The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58:741-747. 2006.
- Suzuki, H., Yano, H., Brown, C.J., Top, E.M.** Predicting plasmid promiscuity based on genomic signature. *Journal of Bacteriology*, 192:6045-6055. 2010.
- Szmolka, A., Fortini, D., Villa, L. Carattoli, A., Anjum, M.F., Nagy, B.** First report on IncN plasmid-mediated quinolone resistance gene qnrS1 in porcine *Escherichia coli* in Europe. *Microbial Drug Resistance*, 17:567-73. 2011.
- Thomas, C.M., Nielsen, K.M.** Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 3:711-21. 2005.
- Threlfall, E.J., Ward, L.R., Skinner, L.A., Rowe, B.** Increase in multiple antibiotic resistance in nontyphoidal *salmonellas* from humans in England and wales: a comparison of data for 1994 and 1996. *Microbial Drug Resistance*, 3:263-26. 1997.
- Toukdarian, A.** Plasmid strategies for broad-host-range replication in Gram-negative bacteria. In: Funnell, B., Phillips, G., eds. *Plasmid Biology*. Washington, DC, ASM Press, 259-270. 2004.
- Trobos, M., Jacobsen, L., Olsen, K.E., Frimondt-Moller, N., Hammerum, A.M., Pedersen, K., Agerso, Y., Porsbo, L.J., Olsen, J.E.** Prevalence of sulphonamide resistance and class 1 integron genes in *Escherichia coli* isolates obtained from broilers, broiler meat, healthy humans and urinary infections in Denmark. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32:367-369. 2008.
- Urumova, V., Petrov, V.** Analysis of antimicrobial drug resistance in enteropathogenic *escherichia coli* (EPEC) isolated in rabbits with diarrhoeic syndrome. *Trakia Journal of Sciences*, 6:36-40. 2008.
- Vaillancourt, J.P., Barnes, J.H.** Coliform cellulitis. In: Saif Y.M. *et al.*, *Diseases of Poultry*, 11th edition, Ames, Iowa State Press, USA, 652-656. 2003.
- Van den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E.** Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14:327-333. 2000.
- Van Elsas, J.D., Semenov, A.V, Costa, R., Trevors, J.T.** Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects, *International Society for Microbial Ecology*, 5:173-183, 2011.
- Van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Veldman, K., Mevius, D.** Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter spp.* in the Netherlands. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 746-750. 2007.

Van Hoek A.H.A.M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P. Aarts, H.J. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology*, 2:203. 2011.

Vandemaele, F., Vereecken, M., Derijcke, J., Goddeeris, M. Incidence and antibiotic resistance of pathogenic *Escherichia coli* among poultry in Belgium. *Veterinary Record*, 151:355-356. 2002.

Vetting, M.W., Park, C.H. Hegde, S.S., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Blanchard, J.S. Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase aac(6')-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone-active aac(6')-Ib-cr variant. *Biochemistry*, 47:9825-9835. 2008.

Vien, L.T., Minh, N.N., Thoung, T.C., Khuong, H.D., Nga, T.V., Thompson, C., Campbell, J.I., de Jong, M., Farrar, J.J., Schultsz, C., vsn Doom, H.R., Baker, S. The co-selection of fluoroquinolone resistance genes in the gut flora of Vietnamese children. *PloS One*, 7:e42919. 2012.

Villa, L. García-Fernández, A., Fortini, D., Carattoli, A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65:2518-29. 2010.

Vinuè, L., Saenz, Y., Somalo, S., Escudero, E., Moreno, M. A., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62:934-937. 2008.

von Baum, H., Marre, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *International Journal of Medical Microbiology*, 295:503-511. 2005.

Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., Hooper, D.C., Wang, M. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:1892-1897. 2009.

Wang, Y., He, T., Han, J., Wang, J., Foley, S.L., Yang, G., Wan, S., Shen, J., Wu, C. Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal *Escherichia coli* isolated from the non-human primates in six zoos in China. *Veterinary Microbiology*, 159:53-59. 2012.

Watanabe, T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriology Reviews*, 27:87-115. 1963.

Watanabe, T. Bacterial episomes and plasmids. *CIBA Found. Symposium*, 81-97. 1969.

White, D.G. Antimicrobial resistance in pathogenic *Escherichia coli* from animals. In: Aarestrup, F.M., *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*, ASM Press, Washington, D.C., USA, ch. no. 10. 2006.

- White, P.A., McIver, C.J., Rawlinson, W.D.** Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45:2658-2661. 2001.
- Wilkerson, C., Samadpour, M., van Kirk, N., Roberts, M.C.** Antibiotic Resistance and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* O157:H7 Isolates from Humans and Bovines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3:1066-1067. 2004.
- Winn, W.J., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G.** Koneman's. Testo-Atlante di Microbiologia Diagnostica. Antonio Delfino Editore. Sesta edizione. Vol. 2. pp. 945-1021. 2009.
- Wong, M.H., Chen, S.** First detection of *oqxAB* in *Salmonella* spp. isolated from food. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1):658-660. 2013.
- World Health Organization.** Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. WHO Library Cataloguing in Publication Data. 2011.
- Wright, G.D.** Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57:1451-1470. 2005.
- Xiccato, G., Trocino, A.** Italy, a system of integrated rabbit production. In: Proceedings of the 2nd Congreso Ibérico de Cunicultura: 5 y 6 de junio de 2007; Vila Real, Trás-os-Montes, Portugal, 175-184. 2007.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T., Arakawa, Y.** New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51:3354-60. 2007.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Arakawa, Y.** Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52:1564-1566. 2008.
- Yang, H., Chen, S., White, D. G., Zhao, S., McDermott, P., Walker, R., Meng, J.** Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *Journal of clinical Microbiology*, 42:3483-3489. 2004.
- Yuan, J., Xu, X., Guo, Q., Zhao, X., Ye, X., Guo, Y., Wang, M.** Prevalence of the *oqxAB* gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67:1655-1659. 2012.
- Yue, L., Jiang, H.X., Liao, X.P., Liu, J.H., Li, S.J., Chen, X.P., Chen, C.X., Lu, D.H., Liu, Y.H.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 132:414-420. 2008.

Zhang, X.Y., Ding, L.J., Yue, J. Occurance and characteristic of class 1 and class 2 integrons in resistant *Escherichia coli* isolates from animals and farm workers in northeastern China. *Microbial Drug Resistance*, 15:323-328. 2009.

Zhao, J., Chen, Z., Chen, S., Deng, Y., Liu, Y., Tian, W., Huang, X., Wu, C., Sun, Y., Sun, Y., Zeng, Z., Liu, J.H. Prevalence and Dissemination of oqxAB in *Escherichia coli* Isolates from Animals, Farmworkers, and the Environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54:4219-4224. 2010.

Zhao, X., Xu, C., Domagala, J., Drlica, K. DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 94:13991-13996. 1997.

